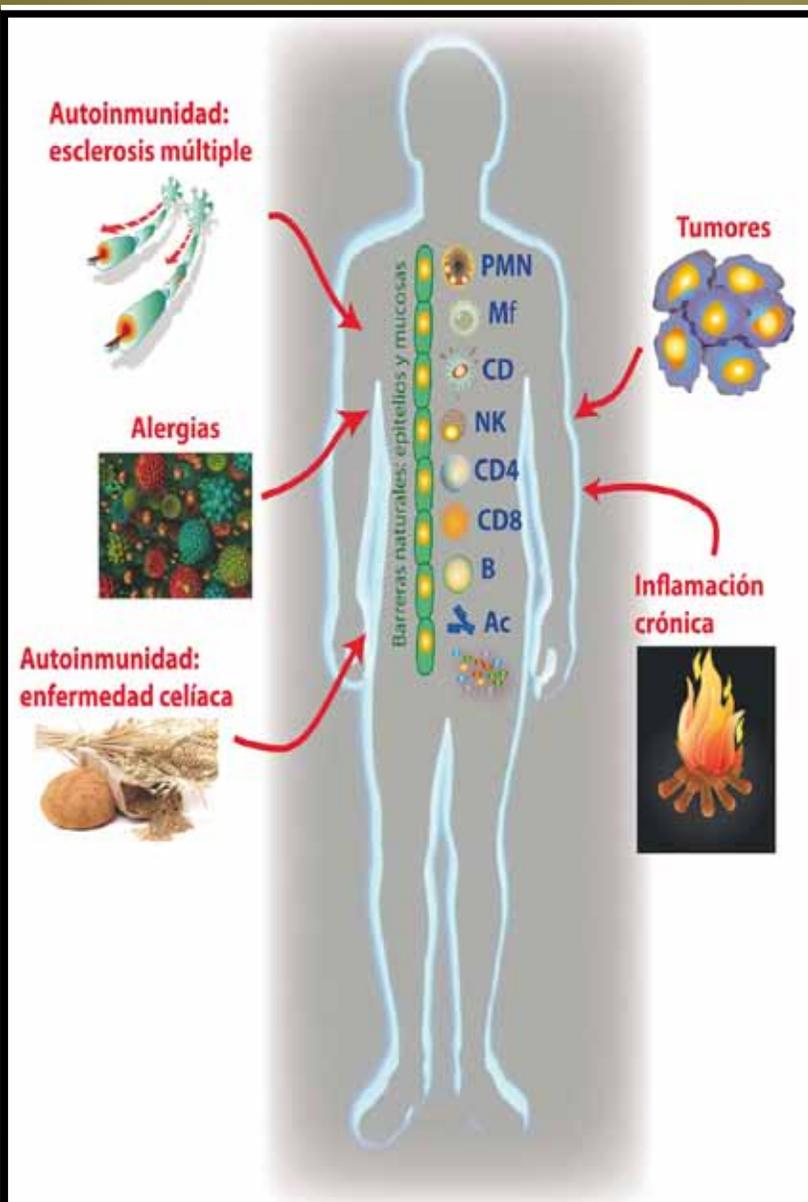


Ciencia e Investigación Divulgación

CI
Divulgación

Primera revista argentina de información científica / Fundada en enero de 1945



ENFERMEDADES ALÉRGICAS Y ALERGIA ALIMENTARIA A LECHE DE VACA: POTENCIALES SOLUCIONES PARA UN PROBLEMA EN CONSTANTE CRECIMIENTO

■ Guillermo Horacio Docena

EL CÁNCER Y SU COMPLEJA RELACIÓN CON EL SISTEMA INMUNE

■ Nicolás Gonzalo Núñez, David Andrés Nocera, Gerardo Gatti, Virginia Andreani, Mariana Maccioni

ENFERMEDADES NEUROINFLAMATORIAS DESMIELINIZANTES Y NUEVAS ALTERNATIVAS TERAPÉUTICAS

■ Santiago P. Méndez Huergo, Marta Toscano, Sebastián Maller, Gabriel Rabinovich

ENFERMEDAD CELÍACA: UNA INMUNOPATOLOGÍA MUY FRECUENTE PERO POCO CONOCIDA

■ Fernando G. Chirido y Eduardo Arranz

SISTEMA INMUNE Y DAÑO POR INFLAMACIÓN

■ Eduardo Chuluyán, Mercedes L. Sánchez, Diego Guerrieri, Nella Ambrosi

COMPROMISO

con el bienestar de todos

HACEMOS
ENERGÍA
NUCLEAR



NUCLEOELÉCTRICA ARGENTINA S.A.

ATUCHA I / ATUCHA II / EMBALSE

Despejá tus dudas sobre la energía nuclear en: www.na-sa.com.ar



Ministerio de
Planificación Federal,
Inversión Pública y Servicios
Presidencia de la Nación

EDITOR RESPONSABLE

Asociación Argentina para el
Progreso de las Ciencias (AAPC)

COMITÉ EDITORIAL

Editora

Dra. Nidia Basso

Editores asociados

Dr. Gerardo Castro

Dra. Lidia Herrera

Dr. Roberto Mercader

Dra. Alicia Sarce

Dr. Juan R. de Xammar Oro

Dr. Norberto Zwirner

**CIENCIA E
INVESTIGACIÓN**

Primera Revista Argentina
de información científica.

Fundada en Enero de 1945.

Es el órgano oficial de difusión de
La Asociación Argentina para el
Progreso de las Ciencias.

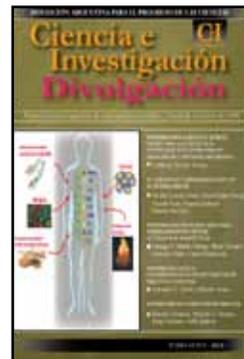
A partir de 2012 se publica en dos
series, Ciencia e Investigación
Divulgación y Ciencia e Investiga-
ción Reseñas.

Av. Alvear 1711, 4° piso,
(C1014AAE) Ciudad Autónoma
de Buenos Aires, Argentina.
Teléfono: (+54) (11) 4811-2998
Registro Nacional de la
Propiedad Intelectual
N° 82.657. ISSN-0009-6733.

Lo expresado por los autores o
anunciantes, en los artículos o
en los avisos publicados es de
exclusiva responsabilidad de los
mismos.

Ciencia e Investigación se
edita on line en la página web
de la Asociación Argentina
para el Progreso de las
Ciencias (AAPC)
www.aargentinapciencias.org

Nuestro sistema inmune ha desarrollado una compleja red de interacciones entre leucocitos polimorfonucleares (PMN), macrófagos (Mφ), células dendríticas (CD), células citotóxicas naturales (NK), linfocitos T CD4 (CD4) y CD8 (CD8), y linfocitos B (B) con el fin de eliminar patógenos invasores a través de la producción de anticuerpos (Ac), mediadores solubles y células citotóxicas. Sin embargo, el sistema inmune también está capacitado para monitorear la aparición de tumores y tratar de eliminarlos. Por otra parte, en determinadas circunstancias el sistema inmune se encuentra desregulado y dispara una activación inapropiada de la respuesta inmune que conlleva el desarrollo de diferentes condiciones inmunopatológicas tales como diversas reacciones alérgicas y enfermedades de etiología autoinmune, las que en determinadas circunstancias se encuentran agravadas por un estado de inflamación crónica.



SUMARIO

EDITORIAL

La inmunología en Argentina. Una rama de las ciencias biomédicas que contribuye al mejoramiento de la salud de la población

Norberto W. Zwirner 3

ARTÍCULOS

Enfermedades alérgicas y alergia alimentaria a leche de vaca: potenciales soluciones para un problema en constante crecimiento

Guillermo Horacio Docena 5

El cáncer y su compleja relación con el sistema inmune

**Nicolás Gonzalo Núñez, David Andrés Nocera,
Gerardo Gatti, Virginia Andreani, Mariana Maccioni** 27

Enfermedades neuroinflamatorias desmielinizantes y nuevas alternativas terapéuticas

**Santiago P. Méndez Huergo, Marta Toscano,
Sebastián Maller, Gabriel Rabinovich** 41

Enfermedad Celíaca: una inmunopatología muy frecuente pero poco conocida

Fernando G. Chirido y Eduardo Arranz 57

Sistema inmune y daño por inflamación

**Eduardo Chuluyán, Mercedes L. Sánchez,
Diego Guerrieri, Nella Ambrosi.** 71

INSTRUCCIONES PARA AUTORES 89

... La revista aspira a ser un vínculo de unión entre los trabajadores científicos que cultivan disciplinas diversas y órgano de expresión de todos aquellos que sientan la inquietud del progreso científico y de su aplicación para el bien.

Bernardo A. Houssay

Asociación Argentina para el Progreso de las Ciencias

COLEGIADO DIRECTIVO

Presidente
Dr. Miguel Ángel Blesa

Vicepresidente
Ing. Arturo J. Martínez

Secretaria
Dra. Alicia Sarce

Tesorero
Dr. Horacio H. Camacho

Protesorero
Dr. Carlos Alberto Rinaldi

Presidentes Anteriores
Dra. Nidia Basso
Dr. Alberto C. Taquini (h)

Presidente Honorario
Dr. Horacio H. Camacho

Miembros Titulares
Ing. Juan Carlos Almagro
Dr. Alberto Baldi
Dr. Máximo Barón
Dr. Eduardo H. Charreau
Dra. Dora Alicia Gutiérrez
Ing. Oscar Mazzantini
Dr. Marcelo Vernengo
Dr. Juan R. de Xammar Oro

Miembros Institucionales
Sociedad Argentina de Cardiología
Sociedad Argentina de Farmacología Experimental
Sociedad Argentina de Hipertensión Arterial
Sociedad Argentina de Investigación Bioquímica
Sociedad Argentina de Investigación Clínica
Unión Matemática Argentina

Miembros Fundadores
Dr. Bernardo A. Houssay – Dr. Juan Bacigalupo – Ing. Enrique Butty
Dr. Horacio Damianovich – Dr. Venancio Deulofeu – Dr. Pedro I. Elizalde
Ing. Lorenzo Parodi – Sr. Carlos A. Silva – Dr. Alfredo Sordelli – Dr. Juan C. Vignaux – Dr.
Adolfo T. Williams – Dr. Enrique V. Zappi

AAPC
Avenida Alvear 1711 – 4º Piso
(C1014AAE) Ciudad Autónoma de Buenos Aires – Argentina
www.aargentinapciencias.org

La inmunología en Argentina. Una rama de las ciencias biomédicas que contribuye al mejoramiento de la salud de la población

Dr. Norberto W. Zwirner ■

Investigador Principal CONICET
Laboratorio de Fisiopatología de la Inmunidad Innata
Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME)
Vuelta de Obligado 2490
C1429ADN Ciudad Autónoma de Buenos Aires
nzwirner@ibyyme.conicet.gov.ar

El año pasado y a instancias de una invitación recibida por parte de las autoridades de la Asociación Argentina para el Progreso de las Ciencias para organizar un número especial de la revista "Ciencia e Investigación" referido a Inmunología, he seleccionado una serie de artículos escritos por investigadores renombrados de nuestro país en el cual intentamos mostrarle a la comunidad de lectores el aporte de la inmunología a la resolución de problemas concretos en nuestra sociedad, en particular en el campo de la inmunidad contra agentes infecciosos. Sin embargo, los microorganismos no son los únicos problemas con los que se debe enfrentar el sistema inmune. Asimismo, la extremadamente fina regulación de la respuesta inmune conlleva el riesgo de la aparición de fenómenos de sobre-activación o activación inapropiada de la respuesta inmune y estas condiciones pueden llevar al desarrollo de diferentes formas de inmunopatología manifestadas como enfermedades concretas en la clínica. Por ello, para este número de la revista he seleccionado otra serie de artículos que tratan sobre algunas de estas condiciones. Concretamente, en este número de Ciencia e Investigación encontraremos un artículo dedicado a las reacciones alérgicas en general y a la alergia a la leche de vaca en particular, y los problemas que han emergido con el empleo de sustitutos a base de leche de soja (artículo aportado por el Dr. Guillermo Docena del Laboratorio en Investigaciones en el Sistema Inmune -LISIN- de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata). Contamos además con un artículo que aborda el problema de los tumores y su compleja relación con el sistema inmune (aporte de la Dra. Mariana Maccioni, del CIBICI, Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba). Otra causa de morbimortalidad importante lo constituyen las enfermedades autoinmunes. Para abordar esta problemática, contamos con el aporte del Dr.

Gabriel Rabinovich y su equipo (del Laboratorio de Inmunopatología, Instituto de Biología y Medicina Experimental, Ciudad de Buenos Aires) y en este artículo se hace una descripción de la problemática de la esclerosis múltiple. En otro artículo se describen una serie de problemas asociados con la enfermedad celíaca artículo que fue aportado por el Dr. Fernando Chirido del Laboratorio en Investigaciones en el Sistema Inmune -LISIN- de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata. Finalmente, el Dr. Eduardo Chuluyán del Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos -CEFYBO- de la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires nos aporta con un artículo en el cual se analizan diversos mecanismos involucrados en el daño tisular provocado por diversas respuestas inflamatorias excesivas y las posibilidades terapéuticas en este terreno. En resumen, existen muchas enfermedades de origen no infeccioso cuyo desarrollo y progresión están íntimamente ligados a la actividad del sistema inmune. Las investigaciones llevadas a cabo probablemente contribuyan a un mejor conocimiento de su etiopatogenia y al desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas, tal como se plantea en cada uno de los artículos aportados. Como ya mencionara en el primer número de la revista dedicado a la inmunología, es mi deseo que el conjunto de artículos que los lectores encontrarán en las páginas siguientes sirva para difundir entre la comunidad científica argentina las actividades que desarrollamos quienes integramos orgullosamente la Sociedad Argentina de Inmunología. Muchas gracias.

ENFERMEDADES ALÉRGICAS Y ALERGIA ALIMENTARIA A LECHE DE VACA: potenciales soluciones para un problema en constante crecimiento

Palabras clave: alergia, alergia alimentaria, leche, soja, inmunoterapia
Key words: allergy, food allergy, cow's milk, soy, immunotherapy

La etiología de la respuesta inmune alérgica es muy compleja y diversos factores han sido descriptos como involucrados en la inducción de las alergias. En las últimas décadas se ha observado un marcado incremento en su prevalencia y actualmente constituyen las inmunopatologías que con mayor prevalencia se presentan en el mundo. La misma tendencia se observa en las alergias alimentarias por lo cual se están realizando nuevos estudios y esfuerzos para comprender su fisiopatología y desarrollar terapias que permitan controlar la

patología. Actualmente el principal tratamiento consiste en evitar la exposición al alérgeno. Sin embargo, existen fuertes evidencias experimentales que demuestran que las inmunoterapias constituyen tratamientos promisorios para corregir el defecto que se presenta en la regulación del sistema inmune en estos desórdenes. La leche de vaca constituye el principal alérgeno alimentario en numerosas regiones del mundo. Frecuentemente se utilizan fórmulas a base de proteínas de soja como sustituto lácteo en el tratamiento de la alergia a la leche de vaca y en algunos pacientes se observa la inducción de una intolerancia sin sensibilización previa a la soja. Esta observación nos llevó a estudiar la reactividad cruzada entre ambos sistemas y, a partir de la identificación de varias proteínas de la semilla de soja de reactividad cruzada con las caseínas bovinas y de la caracterización *in vitro* e *in vivo* de este fenómeno, proponemos el empleo de componentes de soja en el desarrollo de inmunoterapias tolerogénicas e inmunomoduladoras para el tratamiento de las alergias alimentarias.

The etiology of allergies is very complex and several factors have been associated with the induction of these diseases. A rising prevalence of allergy was observed in the last decades and this immunopathology constitutes the most common disease worldwide. A similar trend has been described for food allergies and, hence, efforts should be focused on studies aimed at understanding its physiopathogeny and to develop novel therapies for the treatment of this disease. The most efficient treatment is the strict avoidance of the allergen. However, there are strong evidences that indicate that immunotherapies constitute corrective treatments for the impaired regulation of the immune system in allergic patients.

Milk allergy is the main food allergen in many regions. Soy-based formulae are frequently used as dairy substitutes in the treatment of milk allergic patients. However, some patients develop a clinical intolerance even being not sensitized to soy. This evidence encouraged us to study the cross-reactivity between both systems. We have identified several seed proteins that cross-react with bovine caseins. The *in vitro* and *in vivo* characterization of this phenomenon led us to propose the use of soy components in the development of tolerogenic and immunomodulatory therapies for the treatment of food allergies.

■ ENFERMEDADES ALÉRGICAS. DEFINICIONES Y CONCEPTOS GENERALES

El hombre vive en un medio ambiente rodeado de sustancias

antigénicas, muchas de las cuales son patogénicas, por lo cual le resultaría imposible sobrevivir sin los mecanismos de defensa. A lo largo de la escala evolutiva los microorganismos han sido la presión selectiva

ejercida por el medio que ha moldeado el sistema inmune de los distintos organismos. De esta manera los mecanismos de defensa no son similares en un pez que vive en el agua, una planta que vive en una

■ Guillermo Horacio Docena

Laboratorio de Investigación en el Sistema Inmune-LISIN. Departamento de Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de La Plata. La Plata. Argentina.
guidoc@biol.unlp.edu.ar

zona desértica o en una zona tropical, un invertebrado o un vertebrado. Sin embargo, existen diferentes grados de evolución del sistema inmune en los seres vivos y la máxima expresión en complejidad la podemos encontrar actualmente en los mamíferos. La inmunidad innata y la adaptativa funcionan a través de una compleja red de células y moléculas dirigidas a detectar y clasificar a los antígenos para luego controlarlos o eliminarlos. Sin embargo, existe un grado aún mayor de complejidad que consiste en la posibilidad de coexistir con microorganismos en el propio organismo y ésta es la situación que se presenta con la microbiota en el intestino.

La inmunidad innata, a través de distintos receptores (receptores tipo Toll, receptor de manosa, receptores scavengers, etc), es la encargada de la detección y clasificación de los antígenos procarióticos (a través de la identificación de los MAMPs o patrones moleculares asociados a microorganismos) o de componentes derivados del daño celular (detección de DAMPs o patrones moleculares asociados a daño) e inducir los mecanismos específicos de defensa. Sin embargo, en el universo de antígenos también hay que incluir antígenos del medio ambiente y antígenos de la dieta, dado que a pesar de ser inocuos constituyen sustancias extrañas para el sistema inmune. Por lo tanto, un organismo que se desarrolle en un determinado medio ambiente va a contactar antígenos de diferente tipo y contará con un sistema inmune con cierto grado de complejidad adaptado a funcionar en el medio en el cual se desarrolla.

Frente a esta variedad de antígenos el sistema inmune tiene la capacidad de montar mecanismos activos de *tolerancia* frente a antígenos dietarios y microorganismos presentes en la microbiota (que necesita preservar) y al mismo tiempo

activar mecanismos capaces de eliminar microorganismos patógenos. Estos mecanismos se inducen en las mucosas.

La mucosa gastrointestinal es la mucosa más compleja y desarrolla donde el sistema inmune aprende contra qué antígenos inducir tolerancia o "no respuesta" y contra qué antígenos inducir mecanismos activos que los controlen y, en el mejor de los casos, los eliminen. Los componentes propios pueden en ciertas circunstancias comportarse como antígenos, llamados *autoantígenos*, y desencadenar fenómenos o enfermedades autoinmunes. Para evitar estas situaciones patológicas el sistema inmune induce, desde el mismo inicio en que se generan sus células en el organismo, un conjunto de mecanismos de tolerancia para evitar respuestas activas que terminen dañando los tejidos y órganos propios. Mecanismos similares son los que operan frente a antígenos inocuos del medio ambiente.

Para el caso en particular de los *alergenos*, antígenos que generan respuestas alérgicas, éstos son antígenos presentes en el medio ambiente y en la dieta y en su gran mayoría son sustancias inocuas. Un alérgeno es una sustancia capaz de inducir la activación del sistema inmune (inmunógeno) y luego reaccionar con los elementos generados. Los alergenos más importantes son proteínas, glicoproteínas e hidratos de carbono. Sustancias como el aire, agua, humedad o irritantes químicos que frecuentemente se los suele confundir con sustancias que inducen reacciones alérgicas, no son alergenos. Sin embargo, pueden generar reacciones similares a las alergias, de hecho se las denomina alergias físicas, aunque los mecanismos involucrados son diferentes.

En un individuo normal la respuesta inmune frente a los alergenos es la tolerancia específica que evita la inducción de procesos inflama-

torios frente a estos antígenos. Este fenómeno es muy importante para preservar el proceso de absorción de nutrientes ya que es necesario que los antígenos de la dieta puedan alcanzar el intestino y sean absorbidos. Pero al mismo tiempo resulta un mecanismo necesario para conservar los microorganismos vivos presentes en el lumen intestinal (microbiota) aunque en este caso no se trata de alergenos. Esto refleja que los mecanismos de tolerancia no se han generado en la escala evolutiva para evitar las reacciones alérgicas (que seguramente no existían hace miles o cientos de miles de años) sino que constituyen un aspecto evolutivo de la relación organismos-microorganismos que además es parte del reconocimiento y preservación de lo propio. Así como se ha demostrado que muchos patógenos son capaces de evolucionar a partir de microorganismos comensales, actualmente, se postula que bacterias presentes en la microbiota se han desarrollado a partir de bacterias patógenas del tracto gastrointestinal (por ejemplo Salmonella), lo que les ha permitido adaptarse y sobrevivir en dicho medio sin que sean eliminadas. Para poder establecer este equilibrio y convivir en simbiosis, el sistema inmune asociado a la mucosa gastrointestinal requiere de diversos mecanismos para poder detectar microorganismos no patógenos y no eliminarlos. Por el contrario, frente a un microorganismo patogénico el sistema inmune se activa y genera un foco inflamatorio que, además de favorecer el desarrollo de la inmunidad innata y adaptativa, posibilita la eliminación del antígeno. Esto no ocurre con un antígeno no procariótico e inocuo (sustancia del medio ambiente, de la dieta o un componente propio) dado que a través de los mecanismos de tolerancia evita que se genere un proceso inflamatorio. Sin embargo, existen situaciones en las que el sistema inmune no fun-

ciona de esta manera y se activa en forma inadecuada: son las *reacciones de hipersensibilidad o alergias*.

Se ha definido el término *alergia* como "respuesta alterada o excesiva". Este tipo de enfermedades se conoce desde la época de los egipcios (3000 años A.C con la muerte de un faraón por una anafilaxia causada por una picadura de avispa) también se han encontrado reportes muy antiguos en Grecia y China sobre afectaciones del árbol respiratorio y de la piel, inclusive remarcando asociaciones familiares, pero recién a inicios del siglo XX se caracterizó clínicamente estas afecciones con mayor precisión. Posteriormente, en la década del 60, Gell y Coombs sistematizaron y clasificaron estas reacciones en 5 tipos de reacciones de hipersensibilidad (Gell & Coombs 1963) en base al tiempo que demoraba la aparición de los síntomas y las dosis necesarias para inducirlas. Actualmente, y sobre la base del conocimiento de los mecanismos moleculares y celulares involucrados, los mecanismos de hipersensibilidad se clasifican en 4 tipos (que se corresponden con los de Gell y Coombs):

Tipo I: hipersensibilidad inmediata o mediada por IgE

Tipo II: hipersensibilidad citotóxica o dependiente de anticuerpos (IgG e IgM)

Tipo III: hipersensibilidad mediada por complejos inmunes

Tipo IV: hipersensibilidad retardada o mediada por células

Si bien estas reacciones también pueden ser clasificadas según sean originadas por anticuerpos (Tipo I a III) o células (tipo IV) en todas participan células y en todas el mecanismo de daño es la inflamación. Otro aspecto muy importante que reúnen las reacciones de hipersensibilidad es que requieren contactos previos repetitivos con el antígeno para que

se manifiesten. Esto llevó a definir el término *sensibilización* que se refiere al mecanismo inducido por el primer contacto con el antígeno en el cual se generan los elementos efectores. Por lo tanto, las reacciones de hipersensibilidad requieren que el individuo haya sido previamente sensibilizado o que haya sido expuesto al menos una vez al antígeno desencadenante.

Las *enfermedades alérgicas* son por lo tanto manifestaciones clínicas producto de una falla en los mecanismos de activación o regulación de la respuesta inmune frente a antígenos inocuos, ampliamente distribuidos en el medio ambiente y están mediadas por los mecanismos de hipersensibilidad. Una reacción alérgica puede ser causada por cualquiera de los 4 mecanismos de hipersensibilidad descriptos e inclusive es común que varios mecanismos se presenten en forma simultánea o secuencial en el tiempo en un mismo paciente. Esto determina que en numerosas ocasiones se identifiquen más de un elemento inmunopatogénico (células y/o moléculas) y que se trate de patologías complejas y heterogéneas.

El término *atopia* (del griego *atopos*, o "fuera de lugar"), originalmente propuesto por Coca (1923), se refiere al estado de hipersensibilidad que presentan ciertos individuos (individuos susceptibles) ante la presencia de sustancias o condiciones que para el resto de la población son inocuas y que además presentan una predisposición genética para producir anticuerpos IgE (Kay y col. 2001). Por lo tanto en muchas ocasiones un individuo alérgico es atópico. Un 65-80% de los enfermos con asma bronquial alérgica y rinitis alérgica presentan antecedentes familiares de atopia y, por otro lado, los miembros de una familia de atópicos pueden presentar distintos cuadros clínicos. El modo de herencia de esta condición es poli-

génica multifactorial.

En particular nos interesa describir las reacciones de hipersensibilidad tipo I o inmediatas o atópicas dado que son las más frecuentes y pueden ser las más graves. Se caracterizan, como dijimos anteriormente, por la producción exacerbada de *inmunoglobulinas IgE* para lo cual se requiere la activación de linfocitos B (LB) a células plasmáticas productoras de anticuerpos con la participación de los linfocitos T (LT) *CD4+* o *helper* o *colaboradores* de fenotipo Th2 (LT Th2). La IgE producida y secretada por las células plasmáticas pasa a circulación sistémica y se une a los receptores de alta afinidad presentes en mastocitos (en tejidos), basófilos (en circulación) y eosinófilos (en tejidos y circulación). Esta fase de la respuesta alérgica se denomina *fase de sensibilización* y ocurre con el primer contacto con el alérgeno. Cuando esto se produce en forma repetitiva en individuos atópicos o alérgicos resulta en una exagerada producción y secreción de anticuerpos IgE, situación que caracteriza a esta condición. En individuos no alérgicos la IgE se produce en cantidades mucho menores aún frente a exposiciones repetitivas a los alérgenos. Sólo se encuentran niveles elevados de IgE en infecciones con determinados parásitos.

En individuos alérgicos, exposiciones posteriores al alérgeno determinan su unión a la IgE que se encuentra en la membrana plasmática de las células sensibilizadas (unida a los receptores de alta afinidad) y el entrecruzamiento de al menos dos moléculas de IgE por el alérgeno dispara la activación celular con la consiguiente degranulación y liberación al medio extracelular del contenido de sus gránulos citosólicos en forma inmediata. Aquí se encuentran sustancias con una intensa actividad inflamatoria tales como la histamina. Pero además se induce la síntesis de sustancias pro-inflamato-

rias tales como leucotrienos, prostaglandinas, citoquinas, quimiocinas y factores de crecimiento. Sin embargo, los gránulos citoplasmáticos de los mastocitos, basófilos y eosinófilos contienen también numerosas enzimas, citoquinas y quimiocinas. Por lo tanto, la activación celular genera la rápida liberación de sustancias con actividad farmacológica pro-inflamatoria que origina un foco inflamatorio inmediato, mientras que la inducción de la síntesis de otras sustancias pro-inflamatorias en forma más tardía perpetúa el proceso inflamatorio en el tiempo. Esta segunda etapa de la reacción alérgica se denomina *fase efectora*. En conjunto estos mecanismos determinan que exista una reacción inflamatoria inmediata, y otra tardía en el órgano o tejido (órgano de choque u órgano blanco) donde el alérgeno activa al sistema inmune.

Cuando el alérgeno alcanza la circulación y se une a las IgE de los

basófilos el proceso inflamatorio se denomina *anafilaxia* y constituye la reacción alérgica que más graves consecuencias puede tener en la salud del paciente. Cuando el proceso de activación celular se produce en forma repetitiva sobre un órgano blanco es posible que se genere un infiltrado celular cuyas características dependerán del tejido y tipo de células que se hayan activado. Si persiste la activación celular (inclusive de las células atraídas) se produce el remodelamiento tisular con la posible pérdida de la función del órgano. Esto ocurre por ejemplo en la insuficiencia respiratoria en el paciente con asma alérgico, debido a la acumulación y activación de neutrófilos, eosinófilos y linfocitos. En general para llegar a un cuadro de este tipo se requieren años de propagación del foco inflamatorio y sus características, como así también su respuesta al tratamiento, dependerán del tipo de proceso inflamatorio

instaurado. En estos casos estamos ante una inflamación crónica

Por lo tanto una reacción alérgica requiere de una fase de sensibilización inicial y una fase efectora posterior y puede dar origen a una reacción inmediata (en minutos) y luego una reacción tardía (en horas o días); a su vez la inflamación puede ser aguda o crónica. Por lo tanto, las enfermedades alérgicas son patologías muy complejas y heterogéneas donde no existe un único mecanismo inmunopatogénico. Esto se refleja en la clínica de los pacientes dado que se pueden observar desde reacciones leves (tos, picazón, malestar abdominal, etc) hasta graves (asma, anafilaxia, etc), que afectan a distintos órganos (piel, pulmón, intestino, etc), y pueden manifestarse a distintas edades. Esto implica que cuando se habla de una alergia no nos referimos a una única patología sino que constituye un síndrome con manifestaciones muy heterogéneas

y variables, aún en un mismo individuo, lo cual dificulta en muchos casos el diagnóstico. Los aspectos moleculares y celulares de estas enfermedades no se comprenden aún en su totalidad.

Para el caso en particular de las llamadas alergias físicas, el mecanismo involucrado es diferente dado que no se activan los linfocitos B y no se generan anticuerpos IgE (ni otros isotipos) específicos. El irritante directamente activa a los mastocitos y basófilos induciendo la liberación de las sustancias pro-inflamatorias. Esto ocurre en las "alergias" por calor, por frío o por ejercicio.

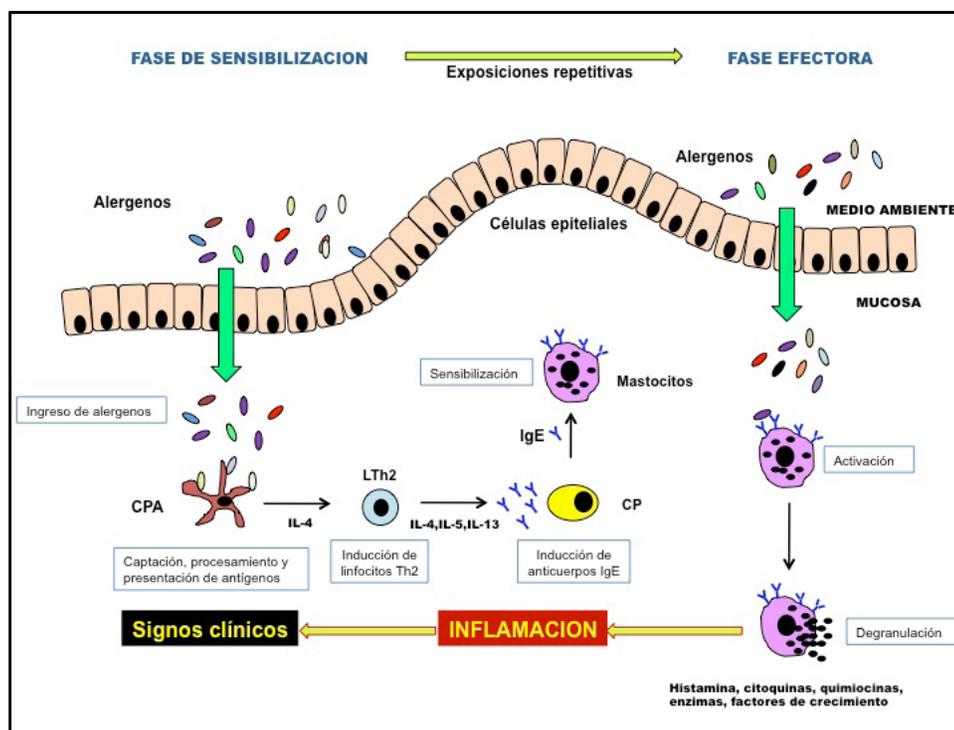


Figura 1: Etapas de una reacción alérgica. Esquema de la fase de sensibilización y de la fase efectora.

CPA: células presentadoras de antígenos, CP: células plasmáticas, LTh2: linfocitos T Th2.

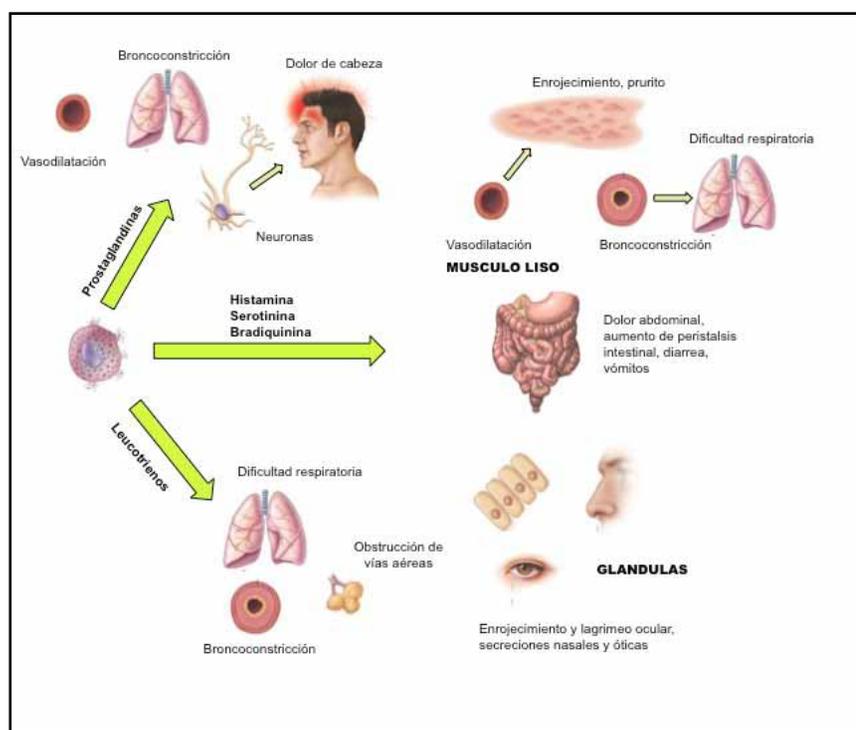


Figura 2: Signos clínicos inducidos por la activación de mastocitos en diferentes órganos y tejidos.

■ ALERGIAS ALIMENTARIAS

Se definen las *alergias alimentarias* como las reacciones de hipersensibilidad desencadenadas por alérgenos alimentarios. Es importante definir correctamente qué son las alergias alimentarias dado que suelen confundirse con una reacción adversa a alimentos. La alergia alimentaria es una reacción adversa originada por la ingesta de alimentos o aditivos alimentarios en la que participa el sistema inmune. Comprenden una amplia variedad de trastornos que pueden ser mediados o no por anticuerpos IgE (Wang y col. 2011). Por lo tanto las alergias alimentarias no constituyen una única patología, sino que involucran diferentes enfermedades o patologías tales como la anafilaxia, el síndrome de alergia oral, la enterocolitis, la esofagitis eosinofílica, la proctocolitis, la gastroenteropatía eosinofílica, la dermatitis atópica, el eccema y otras. En cambio se define una *reac-*

ción adversa a los alimentos en su concepción más amplia como una reacción anómala, desencadenada por alimentos, que puede o no estar mediada por el sistema inmune. Se clasifican en *tóxicas* (que dependen de la toxicidad del alimento tal como pescado en mal estado, chocolate, banana y palta que contienen histamina, alimentos contaminados con microorganismos, etc) y *no tóxicas* (que dependen de la susceptibilidad individual). Entre éstas se encuentran las no mediadas por el sistema inmune o intolerancias (alteraciones anatómicas del tracto gastrointestinal, deficiencias enzimáticas, alteraciones sicosomáticas, etc) y las mediadas por el sistema inmune o reacciones alérgicas (originadas por mecanismos de hipersensibilidad). Por lo tanto una *alergia alimentaria* es un tipo de reacción adversa originada por alimentos en la que el sistema inmune se encuentra involucrado. Se estima que sólo el 15-20% de las reacciones adversas alimenta-

rias son realmente alergias alimentarias, por lo cual resulta sumamente importante definir correctamente los diferentes términos y contar con métodos diagnósticos precisos dado que el tratamiento y el pronóstico son muy diferentes según la patología. Por lo tanto, el diagnóstico de una alergia alimentaria requiere relacionar la sintomatología presente en un paciente con un alimento desencadenante o nocivo y establecer la participación del sistema inmune.

■ INCREMENTO EN LA PREVALENCIA DE LAS ENFERMEDADES ALÉRGICAS, EN PARTICULAR EN LA ALERGIA ALIMENTARIA A LA LECHE DE VACA

Es ampliamente conocido que las alergias tienen una base poligénica de predisposición (se han mapeado diferentes genes en distintos cromosomas) junto a una serie de factores ambientales disparadores (partículas diesel y demás contaminantes ambientales, efecto pro-inflamatorio de distintos pólenes, etc) lo que determina que la herencia sea *poligénica multifactorial*. Desde hace varias décadas se han estudiado e identificado numerosos genes polimórficos en pacientes alérgicos que afectan la predisposición individual al desarrollo de las alergias (atopía). Sin embargo, la predisposición genética por sí sola no puede explicar el marcado aumento en la prevalencia de estas enfermedades observado en las últimas 3 décadas (se ha duplicado por cada década transcurrida). Se ha propuesto que la influencia de factores ambientales disparadores que actúan sobre esta base genética de susceptibilidad serían los responsables de los cambios registrados en determinadas regiones del mundo. Estudios epidemiológicos han revelado que más del 25 % de la población general se encuentra sensibilizada, particularmente en países industrializados, lo

cual representa una cifra alarmante (Sicherer y col.2010).

Aunque estas enfermedades no están directamente relacionadas con la presencia de microorganismos, éstos están íntimamente involucrados en la inducción y regulación de los mecanismos inmunológicos específicos contra los alérgenos. La *hipótesis de la higiene*, luego de casi 30 años de debate, pretende fundamentar el marcado incremento en la incidencia de las alergias en las últimas décadas en determinadas regiones del mundo (Strachan y col. 1989). Esta hipótesis postula que una menor exposición a microorganismos intracelulares patógenos ha sido determinante en la mayor instauración de mecanismos Th2-dependientes frente a la exposición a alérgenos (Okada y col. 2010). Los hábitos de vida en ambientes más limpios, mejores planes de vacunación, mejores antibióticos, alimentos menos contaminados, menor contacto con mascotas, etc. han determinado que el sistema inmune reciba una menor carga de información del medio ambiente relacionada con microorganismos, junto a un mayor contacto con alérgenos debido a hábitos de vida más intra-domiciliarios, ambientes más amoblados, con sistemas centralizados de circulación de aire, etc. Esto implica que el sistema inmune reciba una menor carga de desafíos antigénicos pro-Th1 y más estímulos pro-Th2. Por lo tanto, el sistema inmune en individuos con una susceptibilidad genética tiende a reaccionar de forma Th2-dependiente frente a antígenos inocuos que contacta repetidamente y desencadenar reacciones inflamatorias. En conclusión, la hipótesis de la higiene postula que los cambios producidos en el medio ambiente y en los hábitos de vida en los últimos tiempos en países occidentales o desarrollados impactan en la regulación del sistema inmune. De esta manera los mecanismos IgE-dependientes,

que en la escala evolutiva se han generado como mecanismo de defensa frente a determinados parásitos (macroparásitos que habitan en órganos huecos) se están activando frente a antígenos inocuos del medio ambiente.

Además, es importante considerar que los microorganismos comensales cumplen un papel esencial en el desarrollo y correcto funcionamiento del sistema inmune asociado a las mucosas, principalmente a través del estímulo de la producción de citoquinas inmunosupresoras como IL-10 o TGF- β (Wills-Karp y col. 2001). Es decir que la presencia de microorganismos procarióticos contribuyen al desarrollo de los mecanismos de tolerancia que operan frente a los antígenos inocuos (antígenos de la microbiota, del medio ambiente y de la dieta) (Sudo y col. 1997; Wannemuehler y col. 1982). Por ejemplo, se ha observado que la composición de la microbiota en niños con alergia alimentaria difiere de la de un individuo no alérgico (Ouwehand y col. 2001) lo cual probablemente impacte en un funcionamiento anómalo de los mecanismos de tolerancia. Esta hipótesis es muy difícil de probar aunque ha sido estudiada en modelos animales y se ha demostrado que es posible desencadenar cuadros de alergia simplemente alterando la flora intestinal mediante la administración de antibióticos (Bashir y col. 2004).

En conjunto estos cambios, junto a la globalización (migración de individuos, incorporación de dietas nuevas y a veces exóticas o la modificación de dietas pre-existentes por acceso a nuevos alimentos) han determinado que actualmente las alergias sean las inmunopatologías de mayor prevalencia en el mundo. Un claro ejemplo de cómo un nuevo alimento incorporado en una dieta de una población puede impactar en una enfermedad de este tipo es el caso del kiwi. En países como Esta-

dos Unidos o inclusive en Argentina no existía la alergia al kiwi. Sin embargo actualmente la alergia al kiwi es un problema importante. Asimismo podemos mencionar el caso de aquellas poblaciones que han incluido en la dieta la manteca de maní (Australia, Inglaterra, Canadá, etc). En estos países se está observando un aumento en la incidencia de la alergia al maní en forma similar a lo que ha ocurrido en los Estados Unidos, donde el maní es el alérgeno alimentario más inmunogénico. Esto indica que los hábitos dietarios son un factor central en la instauración de las alergias alimentarias.

Como se mencionó anteriormente, en las últimas décadas se ha observado un incremento muy marcado en la incidencia de las alergias y en determinadas regiones del mundo afectan al 10-30% de la población, lo cual significa que afecta a cientos de millones de individuos (Sicherer y col. 2003, Devereux y col. 2006, Sicherer y col. 2010). La misma tendencia se ha observado en las alergias alimentarias. Actualmente constituyen un problema sanitario preocupante en muchos países (Gupta y col. 2007), incluyendo el nuestro, a tal punto que en ciertas regiones y para ciertos alérgenos se puede hablar de epidemia

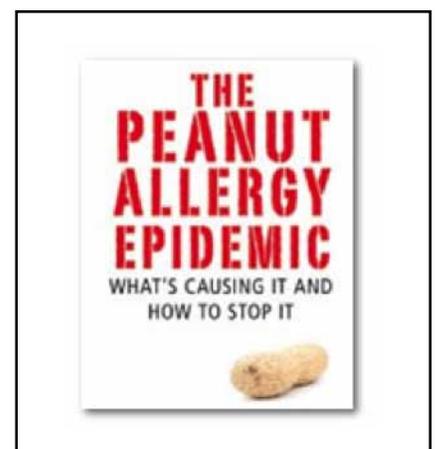


Figura 3: La alergia al maní como ejemplo de enfermedad alérgica epidémica.

de alergias (Sicherer y col. 2010). Tal es el caso de la alergia al maní o la alergia al látex. Esto significa que lo que para la mayoría es un elemento esencial de la vida para otros individuos (y cada vez son más) significa un elemento que les altera completamente los hábitos de vida e incluso puede ser mortal

Los estudios que se deben realizar para establecer valores de incidencia para las alergias alimentarias no son tarea sencilla. Implican en primera instancia una correcta definición de la patología y de criterios claros de diagnóstico. Se han realizado estudios multicéntricos y multidisciplinarios de gran envergadura en Estados Unidos y en Europa que han arrojado la información antes mencionada sobre un rápido e importante incremento en la incidencia de las alergias alimentarias. Además, estos trabajos han estudiado el impacto que diferentes factores tienen sobre la incidencia de esta patología (Pereira y col. 2001, McBride y col. 2012) información que resulta muy importante para comprender su bases moleculares e implementar políticas sanitarias y de control de alimentos, adecuadas. El etiquetado de los alimentos constituye un problema muy serio para los pacientes alérgicos y la legislación vigente en todo el mundo, aunque varía en cada país, dista de proteger al paciente. Frecuentemente se emplean términos que no son familiares para la población en general (por ejemplo "caseinatos" para indicar la presencia de proteínas de la leche) o directamente se omite la presencia de una sustancia alergénica en la composición del alimento. En el mismo sentido, la situación se ha agravado por el hecho que cada vez es mayor el número de alimentos alergénicos. En el pasado era común observar niños alérgicos a 1 ó 2 alimentos mientras que actualmente es común que sean alérgicos a 2 ó 3 alimentos (Høst y col. 2002;

Saarinen y col. 2005). Asimismo, la intensidad con que se presentan las alergias también parece estar modificándose. Un ejemplo que resume lo mencionado lo constituye la leche de vaca: la alergia a la leche de vaca es la alergia alimentaria de mayor prevalencia en el mundo, afecta aproximadamente un 2.5% de la población pediátrica (Rona y col. 2007) y su incidencia se ha incrementado en la última década (Branum y col. 2009). Además es una de las principales causas de reacciones de anafilaxia (Rona y col. 2007) siendo el tercer alimento que produce la mayor cantidad de reacciones anafilácticas fatales en el mundo (Cianferoni y col. 2012). Estos datos deben analizarse en el contexto de las alergias alimentarias en su conjunto cuya prevalencia alcanza cifras de 5-6% de la población general durante el primer año de vida, cifra que cae a los 6 años a un 2.5% y a un 2 % a los 15 años de edad (Rona y col. 2007, Branum y col. 2009). En general todas las alergias alimentarias se manifiestan durante la infancia etapa en la cual no se ha desarrollado completamente el sistema inmune. En adultos, las prevalencias son menores aunque para ciertos alergenos la sensibilización persiste en el tiempo (soja, maní, pescados, frutos secos, etc) con el agravante que pueden originar reacciones sistémica graves (anafilaxia).

Pero no sólo la edad y la dieta impactan en la manifestación de las alergias alimentarias. La forma de consumo de los alimentos o los cambios en las formas de preparación son factores que se deben considerar. El maní es un ejemplo de ello: como ya mencionamos en EEUU el maní es un alergeno alimentario muy importante principalmente por la cantidad de anafilaxias y reacciones fatales que provoca. De los aproximadamente 30.000 casos por año de anafilaxia causada por alimentos, el 80% es causado por

maní con 200 casos fatales por año. Sin embargo, en China se consumen cantidades similares de maní y no se observan los mismos problemas de alergenidad. Esto puede atribuirse a que en China se consume principalmente hervido o frito mientras que en EEUU, el Reino Unido o Australia se consume tostado (Sampson y col. 2004). Se ha demostrado que esta forma de procesamiento incrementa notablemente la alergenidad de este alergeno por la interacción entre las proteínas e hidratos de carbono (Beyer y col. 2001).

Pero la incidencia de las alergias alimentarias depende no sólo del individuo, cómo y cuándo se expone a los alimentos, sino también del alimento, de su inmunogenicidad y características conformacionales. Incluso el pronóstico de una alergia alimentaria y la edad de instauración de la tolerancia también dependen de la conformación de los alergenos. El reconocimiento de epitopes conformacionales en alergenos de la leche determina que se adquiera tolerancia a edades tempranas, mientras una respuesta inmune humoral dirigida a epitopes secuenciales en las caseínas bovinas determina la persistencia de la alergia a leche de vaca (Chatchatee y col. 2001, Wang y col. 2011).

Por lo tanto, existen numerosos factores que deben considerarse al momento de establecer o analizar los datos de incidencia, al mismo tiempo que se intente comprender la historia natural de la patología.

■ TRATAMIENTOS CONVENCIONALES

El hecho que a una cierta edad se instauren los mecanismos de tolerancia en la mucosa gastrointestinal en forma espontánea no significa que la patología se haya curado. Esta condición puede manifestarse en otras mucosas como es el caso de la afectación bronquial. Es común ob-

servar que la alergia a leche o huevo en la primera infancia luego se asocia con la sensibilización a alérgenos ambientales y el desarrollo de asma (Cianferoni y col. 2009). Es decir, que una temprana sensibilización a través del tracto gastrointestinal pone en evidencia la condición de alérgico de un individuo que podrá manifestarse de distinta manera a lo largo de la vida de no mediar un correcto manejo terapéutico.

Existen actualmente diversos tratamientos para las enfermedades alérgicas, sin embargo, muy pocos resultan efectivos como terapias correctivas. El principal inconveniente para el desarrollo de este tipo de terapias es el desconocimiento de los mecanismos inmunopatogénicos e inmunorregulatorios subyacentes en esta patología. Sin embargo, los avances producidos en la caracterización del sistema inmune de mucosas y de los mecanismos de tolerancia e inflamación han impactado marcadamente en este campo y han posibilitado el desarrollo de nuevas inmunoterapias como único procedimiento que hasta el momento ha logrado modificar el curso de las alergias. A pesar de que estas terapias se aplican a las alergias desde hace más de 100 años, actualmente existen numerosas preguntas y situaciones relacionadas con su implementación y seguridad que aún permanecen sin resolver. Remitiéndonos a la historia, Leonard Noon y John Freeman son considerados los pioneros en esta especialidad. A comienzos del siglo XX reportaron los primeros resultados sobre tratamientos con vacunas hiposensibilizantes en pacientes con rinitis alérgica estacional (Noon 1911). Posteriormente, la introducción del primer antihistamínico (Daniel Bovet en 1937, le valió el Premio Nobel en 1957) permitió controlar de mejor manera a los pacientes alérgicos, aunque mediante tratamientos sintomáticos. Recién en 1948 se introdujeron los

corticosteroides a la práctica médica (Hench y Kendall, 1948, les valió el Premio Nobel en 1950). La era del tratamiento farmacológico se expandió marcadamente con los descubrimientos concernientes a las "prostaglandinas y sustancias relacionadas biológicamente activas" que culminaron en 1990 con el desarrollo de medicamentos que bloquean el metabolismo de los leucotrienos o anti-leucotrienos (Samuelsson, Bergström y Vane, Premio Nobel 1982). Finalmente el descubrimiento de las investigaciones de Jerne, Köhler y Milstein (Premio Nobel en 1984) relacionado con las teorías sobre el sistema inmune y el desarrollo de los principios de producción de anticuerpos monoclonales también ha impactado positivamente en la especialidad. El empleo de anticuerpos anti-IgE ha resultado exitoso como terapia en pacientes con asma severa, rinitis y alergia alimentaria (Maurer y col. 2013, Zhu y col. 2013, Lieberman y col. 2013). En el año 2003 se realizó el primer ensayo en pacientes con alergia al maní, con placebo y al azar, empleando el anticuerpo humanizado Hu-901 durante 4 meses (Leung y col. 2003). Los resultados altamente satisfactorios logrados impulsaron la continuidad en el uso de este anticuerpo, inclusive en ensayos clínicos combinado con inmunoterapia, en los que ha resultado efectivo en pacientes con anafilaxia (Lieberman y col. 2013). El principal mecanismo de acción de este anticuerpo es el bloqueo de los anticuerpos IgE circulantes. Sin embargo, se ha observado que también controla la expresión de los receptores específicos de IgE en mastocitos y basófilos, lo que permite reducir la hiperreactividad frente a la exposición al alérgeno.

También se han empleado, como terapias no antígeno-específicas, citoquinas y anticuerpos anti-citoquinas en pacientes con asma, rinitis y dermatitis atópica aunque

el resultado de estos protocolos ha sido muy poco satisfactorio. Se ha estudiado en humanos el uso de receptores solubles de interleuquina (IL)-4, anti-IL-5, anti-IL-9, anti-IL-13, anti-eotaxina, interferón- γ recombinante (rIFN- γ), IL-12 recombinante (rIL-12); mientras que en modelos animales también se ha estudiado el efecto de citoquinas recombinantes tales como IL-10, IFN- γ ., IL-12 e IL-18 y anticuerpos monoclonales contra el receptor de IL-13 (IL-13R α) o IL-4 (IL-4R α), moléculas accesorias de superficie tales como CD80, CD86, CD28 y CD23 y citoquinas tales como IL4, IL-13 y otras.

Con respecto a las *inmunoterapias*, a pesar de haber tenido un comienzo promisorio hubo un período oscuro hasta la década de los 80 en el que el balance beneficio-riesgo fue netamente desfavorable para el paciente, básicamente por las innumerables reacciones adversas (muchas fatales) de los tratamientos subcutáneos. Esto llevó a iniciar una etapa de exploración de nuevas preparaciones antigénicas (extractos estandarizados) y procedimientos. El empleo de rutas alternativas de administración, un mejor conocimiento del sistema inmune, la inclusión de placebos en ensayos clínicos y la elaboración de guías internacionales para los tratamientos (EAACI guidelines 1997, WHO guidelines 1998, ARIA 2001 y actualizaciones 2008 y 2010, WAO 2009, EMA 2009) (Mailing y col. 1997, Bousquet y col. 1998, Bousquet y col. 2001, Bousquet y col. 2008, Brozek y col. 2010) llevó a una visión más optimista sobre este tipo de terapias recién en los inicios del siglo XXI.

Por otro lado, el conocimiento sobre el genoma humano junto con el creciente desarrollo de la industria biotecnológica, determinó un importante impulso al diseño de nuevos fármacos con el potencial desarrollo de novedosas terapias correctivas del sistema inmune. Sin

embargo, el principal reto sigue siendo el control de la patología y de su creciente prevalencia en determinadas regiones del mundo como se desarrolló previamente.

Para el caso de las alergias alimentarias, actualmente el tratamiento más efectivo consiste en la **eliminación estricta del alérgeno ofensivo de la dieta** antes de los 2 años de edad o hasta la instauración de los mecanismos de tolerancia. Sin embargo, algo que parece simple presenta múltiples complicaciones: desde la necesidad de identificar al alimento alérgico hasta la educación del paciente y de su entorno familiar sobre la posibilidad de ocurrencia de reacciones accidentales por la presencia de alérgenos ocultos en los alimentos o las reactividades cruzadas entre diferentes sistemas proteicos. En el recuadro 1 se resumen distintos aspectos relacionados al tratamiento de las alergias a leche de vaca.

Se debe diferenciar la *dieta de restricción* (antes de los 2 años de edad), que requiere el reemplazo de la leche por un sustituto lácteo, de la *dieta de eliminación* (luego de los 2 años de edad) cuando el paciente puede ingerir una mayor variedad de alimentos. En todos los casos la dieta debe adaptarse a las necesidades nutricionales de cada paciente. En referencia a los posibles sustitutos lácteos a emplear, los hidrolizados extensivos de proteínas de leche son la primera opción excepto en pacientes con anafilaxia. Si no son tolerados puede recurrirse a hidrolizados de proteínas de arroz y en última instancia a fórmulas a base de aminoácidos. Existen diversos trabajos que han fijado posición con respecto

al diagnóstico y tratamiento de las alergias alimentarias. En particular el DRACMA o Diagnosis and Rationale for Action Against Cow's Milk Allergy ha desestimado completamente el empleo de fórmulas de soja en niños menores a los 6 meses de edad por problemas nutricionales y para evitar reacciones de hipersensibilidad a edades tempranas (Fiocchi y col. 2010).

Al mismo tiempo, los avances logrados en el desarrollo y optimización de las inmunoterapias correctivas constituyen una opción complementaria al tratamiento restrictivo de esta patología. Estos tratamientos se basan en la inducción de mecanismos de tolerancia específica a través de la estimulación antigénica en forma controlada del sistema inmune asociado a las mucosas (Weiner y col. 1994, Faria y col. 2005). En este sentido el término *tolerancia inmune* se define como la falta de respuesta de la inmunidad adaptativa a un antígeno y puede ser mediado por algunos de los siguientes

mecanismos: delección, inactivación de los LT específicos del antígeno, o inmunomodulación de los LT específicos con la inducción de LTreg. Esta tolerancia inmune es la base de la falta de respuesta del sistema inmune frente a antígenos propios, antígenos no propios inocuos y de la microbiota y en este proceso es central la participación de los linfocitos T regulatorios (LTreg). Estas células pueden generarse durante la ontogenia T en el timo (LTreg naturales) o inducirse a partir de LT específicos de antígeno en la periferia (LTreg inducibles) lo que constituye un mecanismo clave del proceso de tolerancia periférica o extra-tímica. Ambas poblaciones regulatorias se caracterizan por la expresión del factor de transcripción FoxP3. Se ha demostrado en modelos animales y en patologías en humanos que mutaciones en moléculas involucradas en la tolerancia central (mutaciones en el factor de transcripción AIRE o en FoxP3) generan patologías autoinmunes muy graves con manifes-

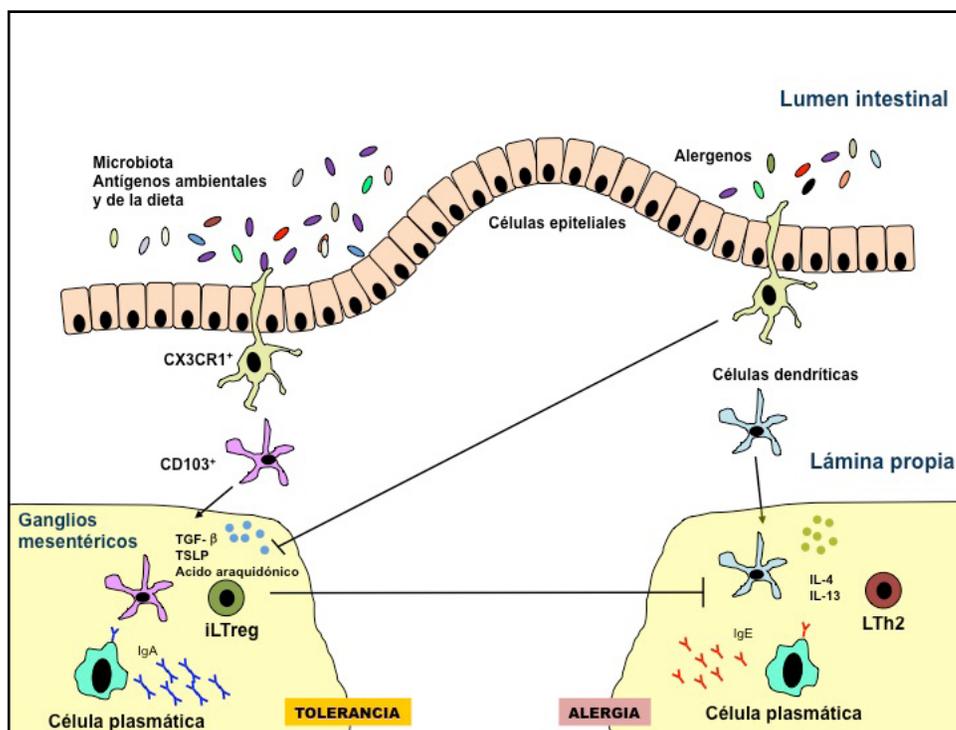


Figura 4: Esquema de los mecanismos de tolerancia y sensibilización en el tracto gastrointestinal.

iLTreg: linfocitos T regulatorios inducibles, LTh2: linfocitos T Th2.

taciones alérgicas (*APECED*-distrofia ectodérmica con candidiasis y poliendocrinopatía e *IPEX*-síndrome de enteropatía, poliendocrinopatía e inmunodesregulación ligado al X, respectivamente) lo cual demuestra la importancia de la expresión de FoxP3 en estas células y de la participación de las mismas en los mecanismos de tolerancia. Es sabido que la inducción de LTreg es altamente dependiente de las células presentadoras de antígeno y del tejido donde se produce este proceso. Esto ha determinado que las nuevas terapias para enfermedades autoinmunes y alérgicas exploten estos conceptos para inducir tolerancia específica. El sitio preferencial para la inducción de LTreg es la mucosa gastrointestinal e incluye la participación de subpoblaciones muy particulares de células dendríticas que presentan los antígenos a los LT bajo condiciones homeostáticas muy particulares (factores específicos producidos por el estroma). Se han caracterizado 2 subpoblaciones de células dendríticas que participan en este mecanismo: las que expresan el receptor CX3CR1 encargadas del muestreo de antígenos del lumen intestinal mediante la emisión de dendritas a través de la barrera epitelial, y las que expresan el marcador CD103, que reciben el antígeno de las células dendríticas antes mencionadas y migran a los ganglios mesentéricos para activar a los LT en el área T. Sin embargo, se ha demostrado que no sólo las células dendríticas intestinales inducen LTreg sino que también pueden inducirse en piel y bronquios. Estos LTreg son los encargados de controlar a las células dendríticas, linfocitos Th2 y linfocitos B (Rescigno y col. 2009).

Es ampliamente conocido que en pacientes con alergia alimentaria la respuesta inmune adaptativa a antígenos dietarios se caracteriza por la producción exacerbada de anticuerpos IgE y la presencia de LT Th2 es-

pecíficos que dirigen la diferenciación de los LB a células plasmáticas productoras de IgE. Esto constituye una evidencia que fallas a nivel de regulación podrían ser las responsables de una inmunidad adaptativa descontrolada. A pesar de que es muy difícil estudiar la respuesta celular asociada a los mecanismos regulatorios en la mucosa intestinal de pacientes con alergia alimentaria se han hallado deficiencias funcionales en los LTreg (menor producción de IL-10 y TGF- β junto a una menor expresión de FoxP3) que permiten sostener esta hipótesis (Shreffler y col. 2009, Nguyen y col. 2009, Krogulska y col. 2011). También se ha demostrado en pacientes alérgicos que existen factores asociados al órgano blanco que se encuentran alterados en comparación con un individuo normal. La linfopoyetina asociada al estroma tímico (TSLP) es el factor más ampliamente asociado a fallas a nivel de tolerancia en diferentes mucosas. Esta quimiocina, inicialmente asociada al desarrollo tímico y a la tolerancia central, actualmente se la ha descrito como un factor soluble que interviene en los mecanismos de tolerancia periférica (Pabst y col. 2012). En pacientes con asma, dermatitis atópica y alergia alimentaria se ha hallado que se encuentra excesivamente expresada y secretada en bronquios, piel e intestino, respectivamente. Se ha demostrado que TSLP induce la diferenciación a células dendríticas con capacidad de generar linfocitos LTh2 (Soumelis y col. 2002, Liu y col. 2006).

Por lo tanto, en individuos alérgicos la inmunidad adaptativa funciona inadecuadamente en las mucosas posiblemente por fallas a nivel de regulación. Por ello, las terapias que posibiliten desviar la activación del sistema inmune parecen ser los procedimientos más promisorios para el control de esta patología.

■ VIEJAS, PERO PROMETEDORAS TERAPIAS

Dado que los tratamientos farmacológicos no corrigen el defecto inmunológico ni aseguran una remisión a largo plazo, es indispensable diseñar nuevas terapias correctivas y definir guías que reduzcan el riesgo de reacciones accidentales. Como mencionamos anteriormente, actualmente se considera que los mecanismos de tolerancia no funcionan adecuadamente en pacientes alérgicos y por lo tanto es lógico considerar a los LTreg como un blanco terapéutico potencial con el objetivo de re-instaurar los mecanismos inmunorregulatorios que permitan controlar la inmunidad adaptativa. Se han realizado esfuerzos en los últimos años dirigidos a optimizar o modificar protocolos pre-existentes y se han obtenido resultados dispares. Es importante resaltar que en estos pacientes, aunque a los 5-7 años de edad la mucosa gastrointestinal normalice la inmunidad y el control de los antígenos dietarios en forma espontánea, esto no significa que el paciente se haya curado o que la patología se haya autolimitado naturalmente. Puede manifestarse en otras mucosas con un cuadro clínico diferente (asma, bronco-constricción, dermatitis, etc).

Las inmunoterapias más modernas se basan en la expansión *in vivo* de los LTreg o en la inducción de LTreg inducibles a través de la administración mucosal de antígenos dietarios en forma controlada. Dado que el principal marcador de los LTreg es el factor de transcripción FoxP3 (los marcadores de membrana son compartidos con otras subpoblaciones celulares) es muy dificultoso su aislamiento. Se están realizando esfuerzos para mejorar su caracterización fenotípica (Hoffmann y col. 2009) y su amplificación *ex vivo* (expansión clonal) de manera de poder desarrollar terapias celulares que permitan reinstaurar la

tolerancia inmune. Esta estrategia ha sido posible en modelos animales y demuestra que la hipótesis planteada puede ser un sólido argumento que aliente a profundizar los estudios de este tipo de terapias. Los trabajos de Ganeshan y col. han demostrado que ratones alérgicos presentan niveles reducidos de TGF- β y FoxP3 (Ganeshan y col. 2009) o que el bloqueo de CTLA-4 incrementa la sensibilización y los síntomas alérgicos frente al desafío antigénico (van Wijk y col. 2005, Kumar y col. 2013). Además, la delección de células que expresan FoxP3 en ratones genera una inflamación intestinal que puede ser revertida mediante la transferencia adoptiva de LTreg FoxP3⁺ (Boehm y col. 2012). Por lo tanto, a partir de estas evidencias experimentales obtenidas en modelos animales es importante establecer si en todos los pacientes las alergias alimentarias están asociadas a defectos en los LTreg.

Las primeras inmunoterapias desarrolladas se basaron en la administración subcutánea del alérgeno en cantidades crecientes (Oppenheimer y col. 1992). Aunque resultaron efectivas para picaduras de insectos y pólenes, para maní y otros alérgenos alimentarios resultaban riesgosas por la frecuente aparición de reacciones anafilácticas al enfrentar los pacientes sensibilizados con el alérgeno nocivo (Casale y col. 2011). Sin embargo, este tipo de procedimientos significó un importante avance en el tratamiento de las alergias constituyendo la base para el posterior desarrollo de la inmunoterapia oral y, más recientemente, de la inmunoterapia sublingual en la década del '80 (para huevo, leche y

maní). Estos protocolos han logrado incrementar el umbral de tolerancia para la exposición al alérgeno o al alimento alérgico en el 80% de los pacientes tratados, disminuir los niveles de IgE específica e incrementar los niveles de IgG1 e IgG4 específicos (anticuerpos bloqueantes), negativizar las pruebas cutáneas, inducir LT con fenotipos regulatorios (junto a un descenso de IL-4 y aumento de IL-10 y TGF- β) y mantener al paciente en un estado de no respuesta frente a exposiciones naturales al alérgeno durante tiempos variables una vez finalizada la inmunoterapia (Buchanan y col. 2007, Jones y col. 2009). Sin embargo, en todos los ensayos clínicos se han observado reacciones adversas, en su gran mayoría leves pero ocasionalmente severas (Staden y col. 2007). La inmunoterapia nasal ha probado ser un método efectivo, seguro y una alternativa no invasiva a la inmunoterapia subcutánea propuesta por la

Organización Mundial de la Salud (Bousquet y col. 1998). Sin embargo, es poco lo que se conoce sobre su mecanismo de acción y dosis de antígenos a emplear. Esto determina la necesidad de continuar con los estudios y establecer si el resultado alcanzado luego de la terapia es un estado de desensibilización o de tolerancia. Para lograr este fin se requieren estudios prospectivos. En este sentido definimos *desensibilización* como la no respuesta durante el tratamiento mientras que la inducción de *tolerancia* se define como la no respuesta una vez finalizado el mismo.

Posteriormente, se introdujo la inmunoterapia oral y los primeros ensayos clínicos con leche de vaca se realizaron en la década del '80 (Patriarca y col. 1984, Poisson y col. 1988). El primer ensayo al azar y con placebo se realizó recién en el 2008 en 20 pacientes con alergia a leche de vaca mediada por IgE (Skripak y

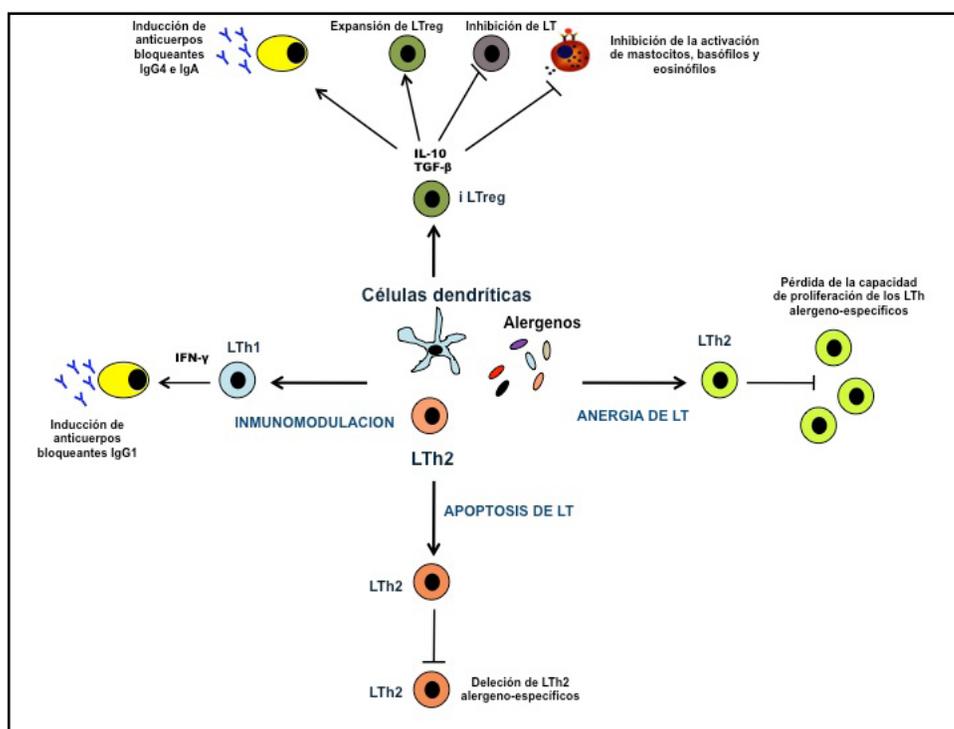


Figura 5: Mecanismos inmunológicos involucrados en las inmunoterapias alérgico-específicas.

LTh1: linfocitos T Th1, LTh2: linfocitos T Th2, iLTreg: linfocitos T regulatorios inducibles.

col. 2008). A pesar que aproximadamente un 20% de los pacientes debieron suspender el tratamiento por las reacciones adversas inducidas se alcanzó un incremento en el umbral de tolerancia 50-100 veces superior en el grupo tratado con respecto al grupo control (Staden y col. 2007).

Actualmente esta terapia constituye la mejor opción para el manejo de pacientes con alergia alimentaria. Sin embargo, a pesar de la gran cantidad de estudios que se están realizando, no se ha alcanzado un consenso internacional y no existe en la práctica clínica una inmunoterapia estandarizada y aprobada para su uso rutinario en pacientes (Passalacqua y col. 2012, Sheikh y col. 2012). Esto se debe a que hasta el momento los resultados conseguidos son muy dispares. Podemos destacar como el principal logro de los protocolos aplicados el incremento en el umbral de concentración del alérgeno para la inducción de reacciones de hipersensibilidad. Sin embargo, siguen existiendo limitaciones concernientes a la seguridad de los pacientes y su efectividad a largo plazo. Estas dificultades plantean que probablemente, y a diferencia de lo que se observa en los estudios realizados en modelos animales, se requieran factores adicionales (adyuvantes pro-tolerogénicos) que permitan utilizar dosis menores de antígeno y que favorezcan una expansión de LTreg más vigorosa y duradera para controlar y revertir la respuesta Th2 instaurada. En la figura 5 se muestran los diferentes mecanismos que pueden estar involucrados en una inmunoterapia de este tipo.

Los estudios más recientes han determinado que la inmunoterapia sublingual sea el tratamiento más eficaz principalmente en alergia a diversos pólenes (Canonica y col. 2009). En alergia alimentaria existen escasos estudios clínicos y se han realizado en pacientes con alergia

a avellana, kiwi, pera, maní (Kerzl y col. 2007, Fernandez Rivas y col. 2009) y leche de vaca (de Boissieu y col. 2006, Patriarca y col. 2007). Existe un único estudio que compara la inmunoterapia oral con la sublingual (Keet y col. 2011) y concluye que la principal ventaja de la inmunoterapia sublingual es la menor cantidad de alérgeno que se requiere administrar (100-400 veces) dado que es posible inducir los mecanismos de tolerancia en la mucosa oral sin la necesidad que el alérgeno alcance el intestino y sea absorbido. Esto se refleja en la menor cantidad de reacciones adversas que se observan (1/10 pacientes para inmunoterapia sublingual, respecto de 14/20 para inmunoterapia oral) por lo que se considera que esta terapia constituye un tratamiento más seguro y una opción a considerar en aquellos pacientes en los que la inmunoterapia oral desencadena reacciones adversas. Sin embargo, tampoco existe al momento un consenso internacional sobre las condiciones para su aplicación (duración, frecuencia de administración, cantidades y tipos de alérgenos, vías de administración, edad de inicio, etc). Inclusive existe la controversia sobre si es posible diseñar guías terapéuticas consensuadas o en realidad habría que definir terapias adaptadas a cada paciente para garantizar eficiencia y seguridad.

Consecuentemente, se podrían proponer las siguientes modificaciones o alternativas a introducir en las inmunoterapias tolerogénicas con el objeto de mejorar su calidad y efectividad:

-empleo de adyuvantes pro-tolerogénicos: se ha demostrado la capacidad de proteínas secretadas por microorganismos de interferir la respuesta inmune a diferentes niveles como estrategia de evasión de la respuesta inmune. En particular el grupo de Sun y col. ha logrado inducir células CD4⁺ CD25⁺ con

propiedades regulatorias empleando una proteína de *Schistosoma japonicum* que interactúa con células dendríticas (Sun y col. 2012). También se ha demostrado la capacidad de proteínas de choque térmico de origen bacteriano (homólogas a HSP 60 humana) de prevenir o atenuar el daño por procesos inflamatorios a través de la inducción de células regulatorias (Hauet Broere y col. 2006). El empleo de estos componentes como adyuvantes pro-LTreg podría ser una herramienta a considerar en inmunoterapias tolerogénicas que además permitirían reducir la dosis de antígeno.

-empleo de adyuvantes para el direccionamiento de un alérgeno a las células presentadoras de antígenos mucosales: se ha explotado esta propiedad adyuvante mediante el empleo de nanopartículas poliméricas (De Souza Rebouças y col. 2012). Esta tecnología permite además proteger al antígeno de la degradación enzimática, degradación por cambios de pH y por la acción de la bilis, su dosificación y direccionar el antígeno al sitio de procesamiento adecuado, ya que se ha demostrado que células presentadoras de antígenos intestinales fagocitan estas partículas. Se han estudiado vacunas mucosales empleando partículas de diferente tamaño (subcelular, 10-1000nm), polímeros (sintéticos y naturales), diferentes cubiertas (hidrofílicas, hidrofóbicas, con carga, etc), partículas biodegradables y no biodegradables y formas de preparación (nanoencapsuladas y nanoesferas). Estas vacunas han resultado eficientes con proteínas, péptidos y ácidos nucleicos (Csaba y col. 2009). El polímero natural más ampliamente estudiado para vacunas mucosales es el quitosano. Este polisacárido puede ser fácilmente derivatizado, es biodegradable, biocompatible y tiene la propiedad de atravesar la barrera epitelial de la mucosa intestinal y nasal. Estas pro-

iedades han determinado que se lo haya incorporado en numerosas vacunas mucosales, en particular como vacuna nasal u oral en modelos animales de alergia (Liu y col. 2009, Islam y col. 2012,). Además se ha demostrado que presenta una particular tendencia a ser captada por células dendríticas de la cavidad oral e inducir tolerancia, por lo cual representan una formulación válida para ser empleada en vacunas sublinguales (Saint-Lu y col. 2009).

-diseño de quimeras o proteínas de fusión con capacidad incrementada de inducir LTreg: el empleo de proteínas alimentarias en forma recombinante ha resultado un tratamiento muy satisfactorio en modelos animales de alergia alimentaria (Li y col. 2003). El mapeo de epitopes B y T en la mayoría de los alérgenos principales de distintos sistemas alimentarios ha posibilitado que se obtengan alérgenos recombinantes modificados con reducida capacidad de unión e IgE (epitopes IgE mutagenizados), pero que al mismo tiempo puedan estimular linfocitos T específicos. La administración de estos péptidos por vías mucosales plantea una novedosa oportunidad para inducir mecanismos de tolerancia con reducida toxicidad. La tecnología del DNA recombinante junto a la exploración de nuevos sistemas de producción de proteínas (células vegetales y plantas, células de mamíferos, etc) han posibilitado superar obstáculos y limitaciones de los sistemas convencionales de producción que ha impactado notablemente en el campo de la vacunología. La posibilidad de construir proteínas quiméricas combinando epitopes T con *linkers* en una misma molécula (Meyer y col. 2002) o fusionar epitopes T a una proteína carrier como la elastine-like protein (Soria-Guerra y col. 2011) abre nuevas perspectivas en el diseño de vacunas mucosales. Un ejemplo en este sentido lo constituye la expresión constitutiva

o transiente de péptidos tolerogénicos (contienen epitopes T) en semillas de arroz y su administración por vía oral en ratones alérgicos al polen durante 4 semanas. Se observó una reducción del score clínico frente al desafío con el alérgeno y un control de la respuesta inmune mediada por células Th2 (Takagi y col. 2005).

-combinación de terapias: a partir de los buenos resultados alcanzados mediante la combinación de inmunoterapia subcutánea con aeroalérgenos junto a una terapia a-IgE (Omalizumab) en pacientes asmáticos (Massanari y col. 2010) se ha iniciado un ensayo clínico de inmunoterapia sublingual con proteínas de maní con un pre-tratamiento con a-IgE. El argumento de esta estrategia terapéutica se centra en que el pre-tratamiento de los pacientes con Omalizumab disminuye las reacciones adversas, lo cual permite llegar a la dosis de mantenimiento en forma más rápida e inducir los mecanismos de tolerancia en forma más eficiente (Peanut Oral Immunotherapy and Anti-Immunoglobulin E for Peanut Allergy, 2009, W Burks actualmente en fase 2).

El desarrollo de nuevas terapias y la combinación de las mismas probablemente resulte satisfactorio en el control de esta patología en un futuro próximo.

■ APORTES REALIZADOS AL TEMA

En nuestro laboratorio hemos desarrollado un modelo de alergia alimentaria a leche de vaca mediado por IgE en ratones. Mediante la administración del alérgeno por vía oral junto a toxina colérica inducimos la instauración de una respuesta inmune Th2 en la mucosa intestinal, con una producción exacerbada de las citoquinas Th2 IL-5 e IL-13 a nivel local y sistémico. Al desafiar los animales con el antígeno por vía oral se observa la inducción de reacciones de hipersensibilidad que

se correlacionan con un incremento en los niveles plasmáticos de histamina y niveles elevados de IgE sérica. Por lo tanto, consideramos que este modelo reproduce la fase efectora de la alergia alimentaria que se observa en pacientes (Smaldini y col. 2012). Contar con este tipo de modelos nos permite realizar estudios que en pacientes, por cuestiones éticas, no son posibles. Por un lado nos permite estudiar aspectos moleculares y celulares de la fisiopatología de la enfermedad y por el otro nos sirve como herramienta *in vivo* para investigar nuevas terapias en desarrollo. Si bien no siempre es posible la extrapolación de los resultados obtenidos en modelos animales de experimentación al humano, constituye un paso fundamental en la investigación pre-clínica.

Hemos aplicado este modelo murino al desarrollo de diferentes *terapias tolerogénicas e inmunomodulatorias* basadas en la administración por distintas mucosas de los alérgenos o fragmentos de los mismos para revertir el cuadro alérgico. En el caso en particular de los tratamientos tolerogénicos, la administración del alérgeno por vía oral (intra-gástrica o sublingual) induce un incremento en los linfocitos LTreg FoxP3⁺ secretores de IL-10 en la lámina propia del duodeno y postulamos que serían los responsables de la notable mejoría clínica observada en los animales tratados. Estas células se encuentran disminuidas en ratones alérgicos y su inducción suprime la producción de IgE sérica, IL-5 e IL-13 y la consiguiente negativización de la prueba cutánea (Smaldini y col. 2012 y resultados aún no publicados). La aplicación de este protocolo nos permite instaurar los mecanismos de tolerancia que en esta condición se encuentran deprimidos y son los responsables de que en un individuo no alérgico no se generen mecanismos de hipersensibilidad frente a antígenos inocuos

(en este caso leche o soja) que ingresan por la vía oral. Por otro lado, en las terapias inmunomoduladoras, el empleo de componentes de membrana de bacterias que actúan como adyuvantes junto a proteínas de leche bovina permite revertir el cuadro alérgico en modelos de alergia alimentaria y de asma. En los animales tratados observamos niveles de IgE similares a los animales control, un incremento en los niveles séricos de IgG2a específicos y un descenso en los niveles de IL-5 e IL-13, con un incremento de IFN- γ a partir de la expansión *in vitro* de esplenocitos y de linfocitos T de lamina propia. Estos resultados se correlacionaron con la negativización de las pruebas cutáneas y la supresión de los niveles plasmáticos de histamina, aunque el resultado más destacable fue la disminución en el score clínico de los animales sensibilizados, tratados y desafiados oralmente con el antígeno. El mecanismo inmunorregulatorio inducido mediante este protocolo es una respuesta Th1 específica del antígeno que logra controlar la respuesta Th2 alérgica (resultados aún no publicados). Actualmente, estamos estudiando procedimientos de este tipo empleando distintos componentes inmunomoduladores (bacterias vivas, bacterias muertas, componentes de bacterias y péptidos vegetales).

Por lo tanto, el desarrollo de un modelo en ratón de alergia alimentaria a leche de vaca mediado por IgE constituye una herramienta valiosa para el estudio y validación de inmunoterapias que permiten controlar y corregir los mecanismos inmunológicos que se encuentran alterados en las alergias. Este tipo de estudios permite plantear el desarrollo de nuevas terapias a aplicar en pacientes con alergia alimentaria.

■ ALERGI A LECHE DE VACA Y SOJA

Con respecto a la historia natural de la alergia a la leche de vaca podemos resaltar que se manifiesta principalmente en la primera infancia, afectando a un 2-3% de los niños durante el primer año de vida con alrededor de un 80% de los pacientes que desarrollan una tolerancia clínica a los 5 años de edad (Sampson y col. 1999). Alrededor del 60% de los niños con alergia a leche de vaca experimentan reacciones mediadas por IgE, aproximadamente 25% de estos niños conservan dicha sensibilidad en la segunda década de la vida y un 35% pasan a tener otro tipo de alergia alimentaria (Schraner y col. 1993, Sampson y col. 1999). Esta patología refleja lo que se ha observado en otras enfermedades alérgicas con una creciente incidencia (Rona 2007) e intensidad en su manifestación (10-19% de los casos de anafilaxia inducida por alimentos) (Järvinen y col. 2008) en los últimos años.

Con respecto a la alergia a la soja se presenta con prevalencias inferiores a la alergia a leche bovina, incluso en niños atópicos (Kattan y col. 2011), en contra de lo que se esperaba en la última década en función de la gran exposición a la que se encuentra expuesta la población general. Si bien se consume soja bajo distintas formas desde hace más de 100 años, se sabe que es más importante como aeroalergeno (alergenos de la cáscara) que como alergeno alimentario (Codina y col. 2000). La sensibilización oral a los alergenos de la semilla de soja parece no ser un problema relevante, inclusive en la población pediátrica (inferior al 1.5%) por causas que se desconocen (Bruno y col. 1997, Osterballe y col. 2009). Sin embargo, en poblaciones orientales estos valores pueden llegar a un 5% que luego disminuye con la edad (Ahn y col. 2003). La alergia a la soja parece ser un pro-

blema más relevante como alergeno de sensibilización secundaria siendo la alergia a la leche de vaca uno de los alergenos involucrados (Zeiger y col. 1999, Bhatia y col. 2008). De todos modos estos trabajos deben analizarse cuidadosamente y considerar la forma en que se consume la leche y la soja, en cuanto a cantidad y formas de cocción, dado que existe una sensibilidad diferencial de los alergenos a los procesos térmicos o enzimáticos (Mittag y col. 2004). Existen trabajos que no reflejan esta situación en pacientes alérgicos a la leche dado que toleran la soja sin inconvenientes (Katz y col. 2010). El maní y el polen de abedul han sido descritos como alergenos de reactividad cruzada con la soja, aunque sólo se ha demostrado clínicamente la alergenicidad cruzada con el alergeno principal del abedul (Bet v 1) en niños y adultos (Kleine-Tebbe y col. 2002). Con respecto al desarrollo natural de la alergia a la soja, los mecanismos de tolerancia suelen instaurarse más rápidamente que en pacientes con alergia a leche. Sin embargo, en un determinado porcentaje de pacientes suele manifestarse a edades más tardías que la alergia a leche y persistir en la adultez (Savage y col. 2010).

Con respecto al tratamiento, la dieta de restricción es el procedimiento inicial e indicado para ambas alergias, sin embargo es un problema de difícil resolución principalmente en pacientes lactantes. A los inconvenientes de disponibilidad de sustitutos lácteos en nuestro medio y de composición y etiquetado de los alimentos (se emplean frecuentemente componentes de soja como suplementos, contaminantes o adulterantes de distintos alimentos y suelen no estar indicados) debemos adicionar el problema de la reactividad cruzada entre proteínas de la leche y la soja. En EEUU las fórmulas a base de soja constituyen aproximadamente el 25% del mer-

cado de fórmulas para tratamiento (Bhatia y col. 2008) y en nuestro país son una alternativa de uso frecuente principalmente por el elevado costo de los hidrolizados extensivos de leche de vaca o de las fórmulas a base de aminoácidos. Frente a todos estos inconvenientes, la inmunoterapia oral se ha transformado en una opción terapéutica de creciente interés. Existen suficientes evidencias clínicas para sostener su eficiencia en el desarrollo de tolerancia específica y en el manejo clínico del paciente. Sin embargo, se requiere continuar y profundizar los estudios para minimizar las reacciones adversas y fortalecer la instauración de los mecanismos inmunorregulatorios subyacentes.

■ REACTIVIDAD CRUZADA ENTRE LECHE Y SOJA Y SU APLICACIÓN EN LAS INMUNOTERAPIAS

A partir de la nueva clasificación de los alérgenos en superfamilias de proteínas en función de su estructura y función (Breiteneder y col. 2004) se ha facilitado enormemente la comprensión de las reactividades cruzadas mediadas por IgE. Se considera que éstas básicamente se producen entre proteínas con características comunes a nivel de estructura primaria y terciaria. Se emplea el término *reactividad cruzada alérgica* para describir las situaciones clínicas que muestran una reactividad a una fuente claramente definida sin exposición previa.

Se han identificado diversos alérgenos en la leche bovina, siendo las caseínas (80% de las proteínas totales) el principal alérgeno (Wal y col. 2004, Docena y col. 1996). Esta fracción está constituida por diferentes proteínas (α S1-, α S2-, β - y κ -caseínas o Bos d 8) comprenden el 32%, 10%, 28% y 10% respectivamente del total de las proteínas. En α S1-caseína se han mapeado epítopes B prácticamente en toda

su secuencia aminoacídica lo que determina su elevada alergenicidad (Chatchatee y col. 2001, Cerecedo y col. 2008).

Entre las proteínas de soja se han reconocido 28 componentes que pueden ser reconocidos por la IgE presente en el suero de pacientes alérgicos a soja (Shibasaki y col. 1980, Awazuhara y col. 1997). Sin embargo, sólo han sido reconocidas como alérgenos por el Comité de Alérgenos de la IUIS las siguientes proteínas: proteínas hidrofóbicas de la cáscara Gly m 1 y Gly m 2 (Cordina y col. 2000) y las proteínas de semilla Gly m 3 (profilina) (Rihs y col. 1999), Gly m 4 (proteína de defensa o PR-10) (Berkner y col. 2009), Gly m 5 (β -conglícinina 11S) (Mittag y col. 2004), Gly m 6 (glicinina 7S) (Mittag y col. 2004) y Gly m Bd 30K (proteasa cisteínica) (Herman y col. 2003).

Para el caso de la alergia a la leche bovina se ha descrito ampliamente la reactividad cruzada con leches de otras especies, originada por la alta homología de secuencia que existe entre las caseínas de los mamíferos (Rozenfeld y col. 2002, Järvinen y col. 2009); mientras que para los alérgenos de la soja ya hemos mencionado al polen de abedul y proteínas del maní como los principales alérgenos de reactividad cruzada. Sobre la base de estos hallazgos ha sido posible desarrollar una inmunoterapia desensibilizante empleando un extracto de soja en un modelo de alergia alimentaria al maní (Pons y col. 2004). Con respecto a la reactividad cruzada entre alérgenos de soja y abedul existe actualmente en desarrollo un ensayo clínico de inmunoterapia subcutánea con Bet v 1 recombinante (alérgeno principal del abedul) en pacientes con alergia a soja (BASALIT-A multicentre randomised placebo-controlled double-blind clinical trial for the evaluation of efficacy of specific immunotherapy with an

aluminium hydroxide-adsorbed recombinant hypoallergenic derivative of the major birch pollen allergen r Bet v1-FV on Bet v 1 associated soy allergy, iniciado en el 2009) cuyos resultados parciales aún no han sido divulgados.

Nuestro grupo ha trabajado en el estudio de la reactividad cruzada entre alérgenos de la soja y de la leche bovina, situación que no ha sido descrita previamente. A partir de las observaciones clínicas en nuestro medio que describen que un cierto porcentaje de pacientes alérgicos a la leche desarrollan una intolerancia inmediata al recibir fórmulas a base de proteínas o hidrolizados de soja como sustitutos lácteos, como se mencionó anteriormente, decidimos estudiar sus posibles causas. Descartada la contaminación con proteínas de leche confirmamos mediante el empleo de diferentes anticuerpos específicos de proteínas de leche de vaca que existe una reactividad cruzada entre soja y las caseínas bovinas. Obtuvimos distintos alérgenos de la soja en forma recombinante y estudios inmunoquímicos nos permitieron identificar a la glicinina G4 o A5A4B3, Gly m 6.0401 (glicinina perteneciente a la superfamilia de las cupinas), Gly m 5.0101 (subunidad α de la β conglícinina) y Gly m Bd 30K/P34 (alérgeno principal de la soja) como los alérgenos de reactividad cruzada. Hemos mapeado epítopes B y T y el uso del modelo murino de alergia a leche de vaca nos permitió confirmar la relevancia clínica de esta reactividad cruzada. Animales exclusivamente alérgicos a la leche de vaca manifiestan reacciones de hipersensibilidad al exponerlos oralmente a extractos de soja o proteínas recombinantes de la soja. Estos resultados nos llevaron a desarrollar distintos protocolos experimentales para inducir tolerancia cruzada. Empleando proteínas de soja logramos disminuir el score clínico de los animales alérgicos a

leche bovina al ser expuestos a este alérgeno, inhibir la secreción de IgE, negativizar las pruebas cutáneas e inducir linfocitos T con actividad reguladora (productores de IL-10) que serían los responsables de la supresión del cuadro alérgico (Smailini y col. 2012). Inclusive hemos alcanzado resultados satisfactorios mediante la administración sublingual de Gly m Bd 30K/P34 (aún no publicado). Consideramos estos trabajos altamente promisorios para el desarrollo de una vacuna mucosal que permita controlar o prevenir la alergia a leche de vaca y soja.

Además estos resultados nos han permitido comprender porqué pacientes alérgicos a leche desarrollan una intolerancia al ser expuestos a fórmulas a base de soja y tomar las medidas preventivas necesarias (Zeiger y col. 1999, Zoppi y col. 1999, Rozenfeld y col. 2002, Docena y col. 2002, Ahn y col. 2003, Agostoni y col. 2006, Curciarello y col. 2008, Bhatia y col. 2008, Orsi y col. 2009).

■ CONCLUSIONES

Las enfermedades alérgicas son las inmunopatologías que con mayor prevalencia se presentan en el mundo. En las últimas décadas se ha producido un marcado incremento en su incidencia a tal punto que se las considera epidemias en ciertas poblaciones. Esta misma tendencia se ha observado en las alergias alimentarias y sólo puede atribuirse a cambios producidos en los factores ambientales disparadores y a modificaciones en los hábitos de vida que impactan directamente sobre la regulación del sistema inmune. Fallas detectadas a nivel de LTreg en pacientes alérgicos permiten suponer que ésta sería una de las causas de la inmunopatogenia y determinan que las actuales terapias estén dirigidas a corregir el defecto en la regulación del sistema inmune. Por lo

tanto los LTreg se han transformado en un blanco terapéutico atractivo y las inmunoterapias tolerogénicas o inmunomodulatorias constituyen actualmente terapias correctivas promisorias. En particular la alergia a leche de vaca es la principal alergia alimentaria en nuestro país y en el mundo y el control de la misma significa un desafío importante para distintas disciplinas relacionadas con la biomedicina. La exploración de la reactividad cruzada entre alérgenos de la leche y de la soja aplicada al diseño de nuevas inmunoterapias podría significar un aporte potencial que permita controlar la incidencia creciente de esta patología.

■ BIBLIOGRAFÍA

- Agostoni C., Axelsson I., Goulet O., Koletzko B., Michaelsen K., Puntis J., Rieu D., Rigo J., Shamir R., Szajewska H., et al. (2006) Soy protein infant formulae and follow-on formulae: a commentary by the ESPGHAN Committee on Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 42, 352–361.
- Ahn K.M., Han Y.S., Nam S.Y., Park H.Y., Shin M.Y., Lee S.I. (2003) Prevalence of soy protein hypersensitivity in cow's milk protein-sensitive children in Korea. *J Korean Med Sci.* 18, 473-7.
- Awazuhara H., Kawai H., Maruchi N. (1997) Major allergens in soybean and clinical significance of IgG4 antibodies investigated by IgE- and IgG4-immunoblotting with sera from soybean-sensitive patients. *Clin Exp Allergy* 27, 325–332.
- Bashir ME, Louie S, Shi HN, Nagler-Anderson C. (2004) Toll-like receptor 4 signaling by intestinal microbes influences susceptibility to food allergy. *J Immunol* 1, 6978-87.
- Berkner H., Neudecker P., Mittag D., Ballmer-Weber B.K., Schwei-

mer K., Vieths S., Rösch P. (2009) Cross-reactivity of pollen and food allergens: soybean Gly m 4 is a member of the Bet v 1 superfamily and closely resembles yellow lupine proteins. *Biosci Rep.* 29, 183–192.

- Beyer K., Morrow E., Li X.M., Bardina L., Bannon G.A., Burks A.W., Sampson H.A. (2001) Effects of cooking methods on peanut allergenicity. *J Allergy Clin Immunol* 107, 1077-81.
- Beyer K., Castro R., Birnbaum A., Benkov K., Pittman N., and Sampson H.A. (2002) Human milk-specific mucosal lymphocytes of the gastrointestinal tract display a TH2 cytokine profile. *J. Allergy Clin. Immunol.* 109, 707–713.
- Bhatia J., Greer F.; American Academy of Pediatrics Committee on Nutrition. (2008) Use of soy protein-based formulas in infant feeding. *Pediatrics.* 121, 1062-8.
- Boehm F., Martin M., Kesselring R., Schiechl G., Geissler E.K., Schlitt H.J., Fichtner-Feigl S. (2012) Deletion of Foxp3+ regulatory T cells in genetically targeted mice supports development of intestinal inflammation. *BMC Gastroenterol.* 31, 12:97.
- Bousquet J., Khaltaev N., Cruz A.A., Denburg J., Fokkens W.J., Togias A., World Health Organization; GA(2)LEN; AllerGen et al. (2008) Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) 2008 update (in collaboration with the World Health Organization, GA(2)LEN and AllerGen). *Allergy* 63 Suppl 86, 8-160.
- Bousquet J., Lockey R., Malling H.J. (1998) Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases. A WHO position paper. *J Allergy Clin Immunol.* 102, 558-62.
- Bousquet J., Van Cauwenberge P., Khaltaev N., Aria Workshop Group; World Health Organization. (2001) Allergic rhinitis and its

- impact on asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 108, S147-334.
- Branum A.M., Lukacs S.L. (2009) Food allergy among children in the United States. *Pediatrics.* 2009 124,1549-55.
 - Breiteneder H., Radauer C. (2004) A classification of plant food allergens. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 113,821-30.
 - Brozek J.L., Bousquet J., Baena-Cagnani C.E., Bonini S., Canonica G.W., Casale T.B., Global Allergy and Asthma European Network; Grading of Recommendations Assessment, Development and Evaluation Working Group et al. (2010) Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) guidelines: 2010 revision. *J Allergy Clin Immunol.* 126, 466-76.
 - Bruno G., Giampietro P.G., Del Guercio M.J., Gallia P., Giovannini L., Lovati C., Paolucci P., Quaglio L., Zoratto E., Businco L. (1997) Soy allergy is not common in atopic children: a multicenter study. *Pediatr Allergy Immunol.* 8, 190-3.
 - Buchanan A.D., Green T.D., Jones S.M., Scurlock A.M., Christie L., Althage K.A., Steele P.H., Pons L., Helm R.M., Lee L.A., Burks A.W. (2007) Egg oral immunotherapy in nonanaphylactic children with egg allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 119, 199-205.
 - Canonica G.W., Bousquet J., Casale T., Lockey R.F., Baena-Cagnani C.E., Pawankar R. et al. (2009) Sublingual immunotherapy: World Allergy Organization Position Paper. *Allergy* 64, 1-59.
 - Casale T.B., Stokes J.R. (2011) Future forms of immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol.* 127, 8-15
 - Cerededo I., Zamora J., Shreffler W.G., Lin J., Bardina L., Dieguez M.C., Wang J., Muriel A., de la Hoz B., Sampson H.A. (2008) Mapping of the IgE and IgG4 sequential epitopes of milk allergens with a peptide microarray-based immunoassay. *J Allergy Clin Immunol.* 122, 589-94.
 - Chatchatee P., Järvinen K.M., Bardina L., Vila L., Beyer K., Sampson H.A. (2001) Identification of IgE and IgG binding epitopes on beta and kappa-casein in cow's milk allergic patients. *Clin Exp Allergy.* 2001 31, 1256-62.
 - Cianferoni A., Muraro A. (2012) Food-induced anaphylaxis. *Immunol Allergy Clin North Am.* 32, 165-95.
 - Cianferoni A., Spergel J.M. (2009) Food allergy: review, classification and diagnosis. *Allergol Int.* 58, 457-66.
 - Codina R., Arduoso L., Lockey R.F., Crisci C., and Bertoya, N. (2000) Sensitization to soybean hull allergens in subjects exposed to different levels of soybean dust inhalation in Argentina. *J. Allergy Clin. Immunol.* 105, 570-576.
 - Csaba N., Garcia-Fuentes M., Alonso M.J.. (2009) Nanoparticles for nasal vaccination. *Adv Drug Deliv Rev.* 27, 140-57
 - Curciarello R, Lareu JF, Fossati CA, Docena GH, Petruccelli S. (2008) Immunochemical characterization of Glycine max L. Merr. var Raiden, as a possible hypoallergenic substitute for cow's milk-allergic patients. *Clin Exp Allergy.* 38, 1559-65.
 - de Boissieu D., Dupont C. (2006) Sublingual immunotherapy for cow's milk protein allergy: a preliminary report. *Allergy.* 61, 1238-9.
 - De Souza Rebouças J., Esparza I., Ferrer M., Sanz M.L, Irache J.M., Gamazo C. (2012) Nanoparticulate adjuvants and delivery systems for allergen immunotherapy. *J Biomed Biotechnol.* 2012, 474605.
 - Devereux G. (2006) The increase in the prevalence of asthma and allergy: food for thought. *Nat Rev Immunol.* 6, 869-74.
 - Docena G., Rozenfeld P., Fernández R., Fossati C.A. (2002) Evaluation of the residual antigenicity and allergenicity of cow's milk substitutes by in vitro tests. *Allergy.* 57, 83-91.
 - Docena G.H., Fernandez R., Chirido F.G., Fossati C.A. (1996) Identification of casein as the major allergenic and antigenic protein of cow's milk. *Allergy.* 51, 412-6.
 - Faria A.M., Weiner H.L. (2005) Oral tolerance. *Immunol Rev.* 206, 232-59.
 - Fernández-Rivas M., Garrido Fernández S., Nadal J.A., Díaz de Durana M.D.A., García B.E., González-Mancebo E., Martín S., Barber D., Rico P., and Tabar A.I. (2009) Randomized double-blind, placebo-controlled trial of sublingual immunotherapy with a Pru p 3 quantified peach extract. *Allergy* 64, 876-883.
 - Fiocchi A., Schünemann H.J., Brozek J., Restani P., Beyer K., Troncone R., Martelli A., Terracciano L., Bahna S.L., Rancé F., Ebisawa M., Heine R.G., Assa'ad A., Sampson H., Verduci E., Bouygue G.R., Baena-Cagnani C., Canonica W., Lockey R.F.. (2010) Diagnosis and Rationale for Action Against Cow's Milk Allergy (DRACMA): a summary report. *J Allergy Clin Immunol.* 126, 1119-28.
 - Ganeshan K., Neilsen C.V., Hadsaitong A., Schleimer R.P., Luo X., Bryce P.J. (2009) Impairing oral tolerance promotes allergy and anaphylaxis: a new murine food allergy model. *J Allergy Clin Immunol.* 123, 231-238.
 - Gell P.G.H., Coombs R.R.A., eds. (1963) *Clinical Aspects of Immunology.* 1st ed. Oxford, England: Blackwell.
 - Gupta R., Sheikh A., Strachan D.P., Anderson H.R. (2007) Time trends in allergic disorders in the UK. *Thorax* 62, 91-6.
 - Hauet-Broere F., Wieten L., Guichelaar T., Berlo S., van der Zee R., Van Eden W. (2006) Heat shock proteins induce T cell regulation of chronic inflammation. *Ann Rheum Dis.* 65, 65-8.

- Herman E.M., Helm R.M., Jung R., and Kinney A.J. (2003) Genetic modification removes an immunodominant allergen from soybean. *Plant Physiol.* 132, 36–43.
- Hoffmann P., Boeld T.J., Eder R., Huehn J., Floess S., Wiczorek G., Olek S., Dietmaier W., Andreesen R., Edinger M. (2009) Loss of FOXP3 expression in natural human CD4+CD25+ regulatory T cells upon repetitive in vitro stimulation. *Eur J Immunol.* 39, 1088–97.
- Høst A., Halken S., Jacobsen H.P., Christensen A.E., Herskind A.M., Plesner K. (2002) Clinical course of cow's milk protein allergy/intolerance and atopic diseases in childhood. *Pediatr Allergy Immunol* 13, 23–28.
- Islam M.A., Firdous J., Choi Y.J., Yun C.H., Cho C.S. (2012) Design and application of chitosan microspheres as oral and nasal vaccine carriers: an updated review. *Int J Nanomedicine* 7, 6077–93.
- Järvinen K.M., Chatchatee P. (2009) Mammalian milk allergy: clinical suspicion, cross-reactivities and diagnosis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 9, 251–8.
- Järvinen K.M., Sicherer S.H., Sampson H.A., Nowak-Węgrzyn A. (2008) Use of multiple doses of epinephrine in food-induced anaphylaxis in children. *J Allergy Clin Immunol.* 122, 133–8.
- Jones S.M., Pons L., Roberts J.L., Scurlock A.M., Perry T.T., Kulis M., Shreffler W.G., Steele P., Henry K.A., Adair M., Francis J.M., Durham S., Vickery B.P., Zhong X., Burks A.W. (2007) Clinical efficacy and immune regulation with peanut oral immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol.* 124, 292–300.
- Kattan J.D., Cocco R.R., Järvinen K.M. (2011) Milk and soy allergy. *Pediatr Clin North Am.* 58, 407–26.
- Katz Y., Rajuan N., Goldberg M.R., Eisenberg E., Heyman E., Cohen A., Leshno M. (2010) Early exposure to cow's milk protein is protective against IgE-mediated cow's milk protein allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 126, 77–82.
- Kay A.B. (2001). Allergy and allergic diseases. First of two parts. *N. Engl. J. Med.* 344, 30–37.
- Keet C.A., Frischmeyer-Guerrero P.A., Thyagarajan A., Schroeder J.T., Hamilton R.G., Boden S., Steele P., Driggers S., Burks A.W., Wood R.A. (2012) The safety and efficacy of sublingual and oral immunotherapy for milk allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 129, 448–55.
- Kerzl R., Simonowa A., Ring J., Ollert M., Mempel M. (2007) Life-threatening anaphylaxis to kiwi fruit: protective sublingual allergen immunotherapy effect persists even after discontinuation. *J Allergy Clin Immunol.* 119, 507–8.
- Kleine-Tebbe J., Vogel L., Crowell D. N., Hausteiner U. F. and Vieths, S. (2002) Severe oral allergy syndrome and anaphylactic reactions caused by a bet v 1-related PR-10 protein in soybean, SAM22. *J. Allergy Clin. Immunol.* 110, 797–804.
- Krogulska A., Borowiec M., Polakowska E., Dynowski J., Młynarski W., Wasowska-Królikowska K. (2011) FOXP3, IL-10, and TGF- β genes expression in children with IgE-dependent food allergy. *J Clin Immunol.* 31, 205–15.
- Kumar S., Verma A.K., Das M., Dwivedi P.D. (2013) A molecular insight of CTLA-4 in food allergy. *Immunol Lett.* 149, 101–9.
- Leung, D.Y.M., Sampson, H.A., Yunginger, J.W., Burks, A.W., Jr, Schneider, L.C., Wortel, C.H., Davis, F.M., Hyun, J.D., and Shanhahan, W.R., Jr (2003). Effect of anti-IgE therapy in patients with peanut allergy. *N. Engl. J. Med.* 348, 986–993.
- Li X.M., Srivastava K., Grishin A., Huang C.K., Schofield B., Burks W., Sampson H.A. (2003) Persistent protective effect of heat-killed *Escherichia coli* producing "engineered," recombinant peanut proteins in a murine model of peanut allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 112, 159–67.
- Lieberman J.A., Chehade M. (2013) Use of omalizumab in the treatment of food allergy and anaphylaxis. *Curr Allergy Asthma Rep.* 13, 78–84.
- Liu, Yong-Jun (2006) Thymic stromal lymphopoietin: master switch for allergic inflammation. *J Exp Med.* 203, 269–273.
- Malling H.J. (1997) The position of immunotherapy in the European Academy of Allergology and Clinical Immunology. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 7, 356–7.
- Massanari M., Nelson H., Casale T., Busse W., Kianifard F., Geba G.P., Zeldin R.K. (2010) Effect of pretreatment with omalizumab on the tolerability of specific immunotherapy in allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 125, 383–9.
- Maurer M., Rosén K., Hsieh H.J., Saini S., Grattan C., Giménez-Arnau A., Agarwal S., Doyle R., Canvin J., Kaplan A., Casale T. (2013) Omalizumab for the Treatment of Chronic Idiopathic or Spontaneous Urticaria. *N Engl J Med.* 368, 924–935.
- McBride D., Keil T., Grabenhenrich L., Dubakiene R., Drasutiene G., Fiocchi A., Dahdah L., et al. (2012) WP 1.1 Birth Cohort Update, The EuroPrevall birth cohort study on food allergy: baseline characteristics of 12,000 newborns and their families from nine European countries. *Pediatr Allergy Immunol.* 23, 230–9.
- Meyer D.E., Chilkoti A. (2002) Genetically encoded synthesis of protein-based polymers with precisely specified molecular weight and sequence by recursive direc-

- tional ligation: examples from the elastin-like polypeptide system. *Biomacromolecules* 3, 357-67.
- Mittag D., Vieths S., Vogel L., Becker W., Rihs H., Helbling A., Wüthrich B., and Ballmer-Weber B.K. (2004) Soybean allergy in patients allergic to birch pollen: clinical investigation and molecular characterization of allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.* 113, 148-154.
 - Nguyen K.D., Vanichsarn C., Fohner A., Nadeau K.C.. (2009) Selective deregulation in chemokine signaling pathways of CD4+CD25(hi)CD127(lo)/(-) regulatory T cells in human allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 123, 933-9.
 - Noon L.. Prophylactic inoculation against hay fever. *Lancet* 1911, i: 1572-1573.
 - Okada H, Kuhn C., Feillet H., Bach J-F. (2010) The 'hygiene hypothesis' for autoimmune and allergic diseases: an update. *Clin Exp Immunol.* 160, 1-9.
 - Oppenheimer J.J., Nelson H.S., Bock S.A., Christensen F., Leung D.Y.. (1992) Treatment of peanut allergy with rush immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol.* 90, 256-62.
 - Orsi M., Fernández A., Follett F.R., Marchisone S., Saieg G., Busoni V.B., Tabacco O., Toca C. (2009) Cow's milk protein allergy: proposed guidelines for the management of children with cow's milk protein allergy. *Arch Argent Pediatr.* 107, 459-67).
 - Osterballe M., Mortz C.G., Hansen T.K., Andersen K.E., Bindslev-Jensen C. (2009) The prevalence of food hypersensitivity in young adults. *Pediatr Allergy Immunol.* 20, 686-92
 - Ouwehand A.C., Isolauri E., He F., Hashimoto H., Benno Y., Salminen S. Differences in Bifidobacterium flora composition in allergic and healthy infants. *J Allergy Clin Immunol.* 108, 144-5.
 - Pabst O, Mowat A. (2012) Oral tolerance to food protein. *Mucosal Immunol.* 5, 232-239.
 - Passalacqua G., Landi M., Pajno G.B. (2012) Oral immunotherapy for cow's milk allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 12, 271-7.
 - Patriarca C., Romano A., Venuti A., Schiavino D., Di Rienzo V., Nucera E., Pellegrino S. (1984) Oral specific hyposensitization in the management of patients allergic to food. *Allergol Immunopathol* 12, 275-81.
 - Patriarca G., Nucera E., Pollastrini E., Roncallo C., De Pasquale T., Lombardo C., Pedone C., Gasbarrini G., Buonomo A., Schiavino D. (2007) Oral specific desensitization in food-allergic children. *Dig Dis Sci.* 52, 1662-72.
 - Pereira B., Venter C., Grundy J., Clayton C.B., Arshad S.H, Dean T. (2001). Prevalence of sensitization to food allergens, reported adverse reaction to foods, food avoidance, and food hypersensitivity among teenagers. *Eur J Clin Nutr.* 55, 298-304.
 - Poisson A., Thomas G., Jean-Landais N., Giaufre E. (1988) Rapid acquired tolerance to cow's milk by oral route in a case of severe childhood food allergy. *Allerg Immunol* 20, 67-8.
 - Pons L., Ponnappan U., Hall R.A., Simpson P., Cockrell G., West C.M., Sampson H.A, Helm R.M, Burks A.W. (2004) Soy immunotherapy for peanut-allergic mice: modulation of the peanut-allergic response. *J Allergy Clin Immunol.* 114, 915-21.
 - Rescigno M. Di Sabatino A. (2009) Dendritic cells in intestinal homeostasis and disease. *J Clin Invest.* 119, 2441-50.
 - Rihs H.P., Chen Z., Ruëff F., Petersen A., Rozynek P., Heimann H., and Baur X. (1999). IgE binding of the recombinant allergen soybean profilin (rGly m 3) is mediated by conformational epitopes. *J. Allergy Clin. Immunol.* 104, 1293-1301.
 - Rona R.J, Keil T., Summers C., Gislason D., Zuidmeer L., Sodergren E., Sigurdardottir S.T, Lindner T., Goldhahn K., Dahlstrom J., McBride D., Madsen C. (2007) The prevalence of food allergy: a meta-analysis. *J Allergy Clin Immunol.* 120, 638-46.
 - Rozenfeld P., Docena G.H., Añón M.C., Fossati C.A. (2002) Detection and identification of a soy protein component that cross-reacts with caseins from cow's milk. *Clin Exp Immunol.* 130, 49-58.
 - Saarinen K.M., Pelkonen A.S., Mäkelä M.J. and Savilahti, E. (2005) Clinical course and prognosis of cow's milk allergy are dependent on milk-specific IgE status. *J. Allergy Clin. Immunol* 116, 869-875.
 - Saint-Lu N., Tourdot S., Razafindratsita A., Mascarell L., Berjont N., Chabre H., Louise A., Van Overtvelt L., Moingeon P. (2009) Targeting the allergen to oral dendritic cells with mucoadhesive chitosan particles enhances tolerance induction. *Allergy.* 64, 1003-13.
 - Sampson H.A. (2004) Update on food allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 113, 805-19.
 - Sampson H.A. (1999) Food allergy. Part 1: immunopathogenesis and clinical disorders. *J Allergy Clin Immunol.* 103, 717-28.
 - Savage J.H, Kaeding A.J, Matsui E.C, Wood R.A. (2010) The natural history of soy allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 125, 683-6.
 - Schrandt J.J., van den Bogart J.P., Forget P.P., Schrandt-Stumpel C.T., Kuijten R.H., Kester A.D. (1993) Cow's milk protein intolerance in infants under 1 year of age: a prospective epidemiological study. *Eur J Pediatr.* 152, 640-4.
 - Sheikh A., Nurmatov U., Venderbosch I., Bischoff E. (2012) Oral immunotherapy for the treatment of peanut allergy: systematic review of six case series studies.

- Prim Care Respir J. 21, 41-9.
- Shibasaki M., Suzuki S., Tajima S., Nemoto H., and Kuroume T. (1980) Allergenicity of major component proteins of soybean. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 61, 441-448.
 - Shreffler W.G., Wanich N., Moloney M., Nowak-Wegrzyn A., and Sampson H.A. (2009) Association of allergen-specific regulatory T cells with the onset of clinical tolerance to milk protein. *J. Allergy Clin. Immunol.* 123, 43-52.e7.
 - Sicherer S.H., Muñoz-Furlong A., Godbold J.H., Sampson H.A. (2010) US prevalence of self-reported peanut, tree nut, and sesame allergy: 11-year follow-up. *J Allergy Clin Immunol.* 125, 1322-6.
 - Sicherer S.H., Muñoz-Furlong A., Sampson H.A. (2003) Prevalence of peanut and tree nut allergy in the United States determined by means of a random digit dial telephone survey: a 5-year follow-up study. *J Allergy Clin Immunol.* 112, 1203-7.
 - Skripak J.M., Nash S.D., Rowley H., Brereton N.H., Oh S., Hamilton R.G., Matsui E.C., Burks A.W., Wood R.A. (2008) A randomized, double-blind, placebo-controlled study of milk oral immunotherapy for cow's milk allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 122, 1154-60.
 - Smaldini P., Curciarello R., Candrea A., Rey M.A., Fossati C.A., Petruccelli S., Docena G.H. (2012) In vivo evidence of cross-reactivity between cow's milk and soybean proteins in a mouse model of food allergy. *Int Arch Allergy Immunol.* 158, 335-46.
 - Soria-Guerra R.E., Rosales-Mendoza S., Moreno-Fierros L., López-Revilla R., Alpuche-Solís A.G. (2011) Oral immunogenicity of tomato-derived sDPT polypeptide containing *Corynebacterium diphtheriae*, *Bordetella pertussis* and *Clostridium tetani* epitopes. *Plant Cell Rep.* 30, 417-24.
 - Soumelis V., Reche P.A., Kanzler H., Yuan W., Edward G., Homey B., Gilliet M., Ho S., Antonenko S., Lauerma A., Smith K., Gorman D., Zurawski S, Abrams J., Menon S., McClanahan T., de Waal-Malefyt R, Bazan F., Kastelein R., Liu YJ. (2002) Human epithelial cells trigger dendritic cell mediated allergic inflammation by producing TSLP. *Nat Immunol.* 3, 673-80.
 - Staden U., Rolinck-Werninghaus C., Brewe F., Wahn U., Niggemann B., Beyer K. (2007) Specific oral tolerance induction in food allergy in children: efficacy and clinical patterns of reaction. *Allergy.* 62, 1261-9.
 - Strachan D.P. (1989) Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ* 299, 1259-1260.
 - Sudo N., Sawamura S., Tanaka K., Aiba Y., Kubo C., Koga Y. (1997) The requirement of intestinal bacterial flora for the development of an IgE production system fully susceptible to oral tolerance induction. *Journal of Immunology* 159, 1739-45.
 - Sun X.J., Li R., Sun X., Zhou Y., Wang Y., Liu X.J., Lu Q., Zhou C.L, Wu Z.D. (2012) Unique roles of *Schistosoma japonicum* protein Sj16 to induce IFN- γ and IL-10 producing CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in vitro and in vivo. *Parasite Immunol.* 34, 430-9.
 - Takagi H., Hiroi T., Yang L., Tada Y., Yuki Y., Takamura K., Ishimitsu R., Kawachi H., Kiyono H., Takaiwa F. (2005) A rice-based edible vaccine expressing multiple T cell epitopes induces oral tolerance for inhibition of Th2-mediated IgE responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 17525-30.
 - van Wijk F., Hoeks S., Nierkens S., Koppelman S.J, van Kooten P., Boon L., Knippels L.M, Pieters R. (2005) CTLA-4 signaling regulates the intensity of hypersensitivity responses to food antigens, but is not decisive in the induction of sensitization. *J Immunol.* 1, 174-9.
 - Wal J.M. (2004) Bovine milk allergenicity. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 93, S2-11.
 - Wang J., and Sampson H.A. (2011) Food allergy. *J. Clin. Invest.* 121, 827-835.
 - Wannemuehler M.J., Kiyono H., Babb J.L., Michalek S.M., McGhee J.R. (1982) Lipopolysaccharide (LPS) regulation of the immune response: LPS converts germfree mice to sensitivity to oral tolerance induction. *J Immunol.* 129, 959-65.
 - Weiner H.L., Friedman A., Miller A., Khoury S.J., al-Sabbagh A., Santos L., Sayegh M., Nussenblatt R.B., Trentham D.E., Hafler D.A. (1994) Oral tolerance: immunologic mechanisms and treatment of animal and human organ-specific autoimmune diseases by oral administration of autoantigens. *Annu Rev Immunol.* 12, 809-37.
 - Wills-Karp M., Santeliz J., Karp C.L. (2001) The germless theory of allergic disease: revisiting the hygiene hypothesis. *Nat Rev Immunol.* 1, 69-75
 - Zeiger R.S., Sampson H.A, Bock S.A, Burks A.W. Jr, Harden K., Noone S., Martin D., Leung S., Wilson G. (1999) Soy allergy in infants and children with IgE-associated cow's milk allergy. *J Pediatr.* 134, 614-22.
 - Zhu R., Zheng Y., Putnam W.S., Visich J., Eisner M.D., Matthews J.G., Rosen K.E., D'Argenio D.Z. (2013) Population-Based Efficacy Modeling of Omalizumab in Patients with Severe Allergic Asthma Inadequately Controlled with Standard Therapy. *AAPS J.* 2013 Feb 15.
 - Zoppi G., Guandalini S. (1999) The story of soy formula feeding in infants: a road paved with good intentions. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 28, 541-3.

Recuperación de tecnologías ancestrales y sustentables en Jujuy

La vicuña como modelo de producción sustentable

Ciencia e historia se unen para preservar a la vicuña

**Cazando vicuñas anduve en los cerros
Heridas de bala se escaparon dos.**

**- No caces vicuñas con armas de fuego;
Coquena se enoja, - me dijo un pastor.**

**- ¿Por qué no pillarlas a la usanza vieja,
cercando la hoyada con hilo punzó ?**

**- ¿Para qué matarlas, si sólo codicias
para tus vestidos el fino vellón ?**

Juan Carlos Dávalos, Coquena

Lo primero es pedir permiso a la Pachamama. Porque a ella, en la cosmovisión andina, pertenecen las vicuñas que se extienden por el altiplano de Perú, Bolivia, Chile y Argentina. Una ceremonia ancestral, unida a la ciencia moderna, permite que comunidades y científicos argentinos exploten de manera sustentable un recurso de alto valor económico y social.

La vicuña es una especie silvestre de camélido sudamericano que habita en la puna. Hasta 1950-1960 estuvo en serio riesgo de extinción debido a la ausencia de planes de manejo y conservación. Desde la llegada de los españoles se comenzó con la caza y exportación de los cueros para la obtención de la fibra, que puede llegar a valer U\$600 por kilo, lo que llevo a la casi desaparición de estos animales. Por ese entonces, la población de vicuñas en América era cercana a los 4 millones de ejemplares, en 1950 no eran más de 10.000.

A fines de la década del 70 Argentina, Bolivia, Chile, Perú y Ecuador firmaron un Convenio para la conservación y manejo de la vicuña que permitió recuperar su población hasta contar en la actualidad con más de 76 mil ejemplares en nuestro país.

En Santa Catalina, Jujuy, a 3.800 metros sobre el nivel del mar, investigadores de CONICET, junto a comunidades y productores locales, han logrado recuperar una tecnología prehispánica sustentable para la obtención de la fibra de vicuña. Se trata de una ceremonia ancestral y captura mediante la cual se arrean y esquilan las vicuñas silvestres para obtener su fibra. Se denomina chaku y se realizaba en la región antes de la llegada de los conquistadores españoles. Según Bibiana Vilá, investigadora independiente de CONICET y directora del grupo Vicuñas, Camélidos y Ambiente (VICAM) *"Hoy podemos pensar en volver a hacer ese chaku prehispánico sumado a técnicas que los científicos aportamos para que las vicuñas pasen por toda esa situación sufriendo el menor stress posible. Las vicuñas vuelven a la naturaleza, la fibra queda en la comunidad, y nosotros tomamos un montón de datos científicos."*

El chaku

El chaku es una práctica ritual y productiva para la esquila de las vicuñas. Durante el imperio inca, las cacerías reales o chaku eran planificadas por el inca en persona. En esta ceremonia se esquilaba a las vicuñas y se las liberaba nuevamente a la vida silvestre. La fibra obtenida era utilizada para la confección de prendas de la elite y su obtención estaba regulada por mecanismos políticos, sociales, religiosos y culturales. Se trata de un claro ejemplo de uso sustentable de un recurso natural. Hugo Jacobaccio, zoológico e investigador principal de CONICET, explica que *"actualmente el chaku concentra hasta 80 personas, pero durante el imperio inca participaban de a miles. Hoy las comunidades venden esa fibra a acopiadores textiles y obtienen un ingreso que complementa su actividad económica principal, el pastoreo de llamas y ovejas"*.

El proceso comienza con la reunión de todos los participantes, luego toman una soga con cintas de colores reunidos en semicírculo y arrean lentamente a las vicuñas guiándolas hacia un embudo de red de 1 km de largo que desemboca en un corral. Cuando los animales están calmados se los esquila manipulándolos con sumo cuidado para reducir el stress y se los libera. Hoy, 1500 años después del primer registro que se tiene de esta ceremonia, la ciencia argentina suma como valor agregado: el bienestar animal y la investigación científica. En tiempo del imperio Inca, el chaku se realizaba cada cuatro años, actualmente se realiza anualmente sin esquila a los mismos animales *"se van rotando las zonas de captura para que los animales renueven la fibra"* explica Jacobaccio. Según Vilá *"es un proyecto que requiere mucho trabajo pero que demuestra que la sustentabilidad es posible, tenemos un animal vivo al cual esquilamos y al cual devolvemos vivo a la naturaleza. Tiene una cuestión asociada que es la sustentabilidad social ya que la fibra queda en la comunidad para el desarrollo económico de los pobladores locales."*

Yanina Arzamendia, bióloga, investigadora asistente de CONICET y miembro del equipo de VICAM, explica que se

esquilan sólo ejemplares adultos, se las revisa, se toman datos científicos y se las devuelve a su hábitat natural. Además destaca la importancia de que el chaku se realice como una actividad comunitaria *“en este caso fue impulsada por una cooperativa de productores locales que tenían vicuñas en sus campos y querían comercializar la fibra. Además participaron miembros del pueblo originario, estudiantes universitarios y científicos de distintas disciplinas. Lo ideal es que estas experiencias con orientación productiva tengan una base científica.”*

Paradojas del éxito.

La recuperación de la población de vicuñas produjo cierto malestar entre productores ganaderos de la zona. Muchos empezaron a percibir a la vicuña como competencia para su ganado en un lugar donde las pasturas no son tan abundantes. En este aspecto el trabajo de los investigadores de CONICET fue fundamental, según Arzamendia *“el chaku trae un cambio de percepción que es ventajoso para las personas y para la conservación de la especie. Generalmente el productor ve a las vicuñas como otro herbívoro que compete con su ganado por el alimento y esto causa prejuicios. Hoy comienzan a ver que es un recurso valioso y ya evalúan tener más vicuñas que ovejas y llamas. Nuestro objetivo es desterrar esos mitos”,* concluye.

Pedro Navarro es el director de la Cooperativa Agroganadera de Santa Catalina y reconoce los temores que les produjo la recuperación de la especie: *“Hace 20 años nosotros teníamos diez, veinte vicuñas y era una fiesta verlas porque habían prácticamente desaparecido. En los últimos años se empezó a notar un incremento y más próximamente en el último tiempo ya ese incremento nos empezó a asustar porque en estas fincas tenemos ovejas y tenemos llamas”. Navarro identifica la resolución de estos problemas con el trabajo del grupo VICAM: “Yo creo que como me ha tocado a mí tener que ceder en parte y aprender de la vicuña y de VICAM, se puede contagiar al resto de la gente y que deje de ser el bicho malo que nos perjudica y poder ser una fuente más productiva.”*

La fibra de camélido

Además de camélidos silvestres como la vicuña o el guanaco, existen otros domesticados como la llama cuyo manejo es similar al ganado, para impulsar la producción de estos animales y su fibra, el Estado ha desarrollado dos instrumentos de fomento. En la actualidad se encuentran en evaluación varios proyectos para generar mejoras en el sector productor de fibra fina de camélidos que serán financiados por el Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva. Se trata de dos Fondos de Innovación Tecnológica Sectorial destinados a la agroindustria y al desarrollo social que otorgarán hasta \$35.000.000 y \$8.000.000 respectivamente. Los proyectos destinados a la Agroindustria son asociaciones entre empresas y organismos del sector público con el objetivo de mejorar la calidad de la fibra de camélido doméstico a partir del desarrollo de técnicas reproductivas, mejoramiento genético e innovaciones en el manejo de rebaños; incorporar valor a las fibras a partir de mejoras en la materia prima o el producto final; permitir la trazabilidad de los productos para lograr su ingreso en los mercados internacionales y fortalecer la cadena de proveedores y generar empleos calificados.

La convocatoria Desarrollo Social tiene como fin atender problemas sociales mediante la incorporación de innovación en acciones productivas, en organización social, en el desarrollo de tecnologías para mejorar la calidad de vida de manera sostenible y fomentar la inclusión social de todos los sectores. Otorgará hasta \$8.000.000 por proyecto que mejore las actividades del ciclo productivo de los camélidos domésticos, la obtención y/o el procesamiento de la fibra, el acopio, el diseño y el tejido, el fieltro y la confección de productos.



EL CÁNCER Y SU COMPLEJA RELACIÓN CON EL SISTEMA INMUNE

Palabras clave: cáncer, inmunidad, inflamación, inmunoterapia.
Key words: cancer, immunity, inflammation, immunotherapy.

“Cáncer” es un término genérico que designa un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar cualquier parte del organismo y que también se conocen como “tumores malignos” o “neoplasias”. Implica la multiplicación descontrolada de células anormales o mutadas, que rápidamente adquieren características claramente definidas. Sólo un muy bajo porcentaje de neoplasias están causadas por defectos hereditarios. La gran mayoría (aproximadamente el 90%) está causada por mutaciones somáticas asociada a factores de riesgo que de alguna forma u otra están asociados a inflamación crónica. Paradójicamente, hay también numerosas evidencias de que el sistema inmune puede contribuir a eliminar y/ o controlar la expansión de estas células transformadas. La profundización del conocimiento de cómo funcionan las distintas ramas del sistema inmune innato y adaptativo, de los mecanismos moleculares involucrados en los procesos inflamatorios sumado al advenimiento de técnicas como la citometría de flujo, la inmunohistoquímica y la biología molecular, permitió discernir el complejo diálogo entre sistema inmune y cáncer. A grandes rasgos, se podría simplificar diciendo que algunos componentes del sistema inmune pueden ser considerados factores promotores de la iniciación, promoción y progresión del cáncer y además que pueden actuar paralizando otros mecanismos inmunológicos claves para llevar a cabo la destrucción del tumor. En esta revisión, nos focalizaremos en datos que apoyan la conclusión de que el sistema inmune puede actuar como un mecanismo extrínseco supresor de tumor, pero que también puede promover la iniciación, promoción y progresión del cáncer. También discutiremos el gran desafío actual que consiste en promover las facetas antitumorígenicas del sistema inmunológico y lograr así que éste contribuya eficientemente a la eliminación del tumor.

■ Nicolás Gonzalo Nuñez,
David Andrés Nocera,
Gerardo Gatti,
Virginia Andreani,
Mariana Maccioni*

Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI-CONICET). Departamento de Bioquímica Clínica. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
Haya de la Torre y Medina Allende. Córdoba. 5016. Argentina. TE: 54-351-434-4973/76.
mmaccioni@fcq.unc.edu.ar

The term “cancer” involves a broad group of diseases that can affect any organ or tissue in the organism and that is also known as “malign tumor” or “neoplasia”. It implies the uncontrolled growth of abnormal or mutated cells that rapidly acquire some “hallmarks” that have been clearly defined. Only a very low percentage of cancers are caused by hereditary defects. Most of them (approximately 90%) are caused by somatic mutations associated to risk factors, which are related in some way or another to chronic inflammation. Paradoxically, there is also evidence that indicates that the immune system can contribute to eliminate or to control the spread of these transformed cells. Recent understanding of the molecular and cellular mechanisms involved in the innate and adaptive immune system and the molecular processes governing the inflammatory response as well as the amazing evolution of techniques such as flow cytometry, immunohistochemistry and molecular biology, allowed immunologists to dissect the complex dialog between immune system and cancer. Briefly, some components of the immune system can be considered as big supporters of tumor initiation, promotion and progression and also suppressors of other immunological mechanisms, essential to eliminate tumor cells. However, the immune system can also act as an extrinsic tumor suppressor mechanism. In this review, we will focus on data supporting this fact and we will discuss the current challenge of promoting the antitumorigenic role of the immune system and to make it contribute more efficiently in destroying the tumor.

■ CÁNCER, INFLAMACIÓN E INMUNIDAD

“Cáncer” es un término genérico que designa un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar cualquier parte del organismo. Estas patologías también pueden ser denominadas “tumores malignos” o “neoplasias”. Una característica del

cáncer es la multiplicación rápida de células anormales que presentan fallas en el proceso de división celular, la cual es descontrolada. De esa manera, estas células alteradas o “transformadas” se reproducen y no responden a señales de muerte sino que dan lugar a nuevas células ya alteradas. Estas células anorma-

les, que no son necesarias, forman una masa de tejido llamado tumor. Cuando el tumor generado se extiende más allá de sus límites habituales e invade partes adyacentes del cuerpo o se propaga a otros órganos, sobreviene el proceso conocido como metástasis. Las metástasis son la principal causa de muerte

por cáncer. Según la Organización de la Salud, el cáncer es la segunda causa de muerte después de las enfermedades cardiovasculares; en el año 2008 causó 7,6 millones de defunciones (aproximadamente un 13% del total) (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>). El Instituto Nacional del Cáncer Argentino ha indicado que los tipos de cánceres más comunes en nuestro país son los de pulmón, colon y recto, mama y próstata (<http://www.msal.gov.ar/inc/>).

Sólo un muy bajo porcentaje de neoplasias están causadas por defectos hereditarios. La gran mayoría (aproximadamente el 90%) está causada por mutaciones somáticas asociada a factores de riesgo que de alguna forma u otra están asociados a inflamación (Aggarwal y col., 2009). En general, se acepta que la transformación de una célula normal en "maligna" o neoplásica es un proceso multifásico y suele ser el resultado de la interacción entre los factores genéticos del paciente y agentes ambientales mutágenos. Entre estos últimos, los más conocidos son los carcinógenos físicos (radiaciones ultravioleta e ionizantes); carcinógenos químicos (asbestos, los componentes del humo de tabaco, las aflatoxinas, o el arsénico) o carcinógenos biológicos (infecciones causadas por determinados virus, bacterias o parásitos). Paradójicamente, en la actualidad se sabe que estos carcinógenos no sólo son capaces de dañar *per se* el ADN celular sino que también son fuertes promotores de inflamación. Así, un 20% de cánceres están asociados a infecciones virales crónicas; 30% pueden ser atribuidos a la exposición a tabaco e inhalación de silica y asbestos y un 35% puede ser atribuido a factores dietarios (un 20% del desarrollo del cáncer está asociado a obesidad) (Aggarwal y col., 2009; Mantovani y col., 2008; Coussens y col., 2002).

La fuerte relación entre carcinogénesis e inflamación (la cual puede o no ser secundaria a una infección) ha sido el motivo de muchos estudios a nivel molecular, celular, animal y clínico. Esta asociación fue detectada hace aproximadamente 2000 años atrás por Galeno, el célebre médico griego de principios de la era cristiana. En efecto, Galeno describió las similitudes entre cáncer e inflamación y la posibilidad de que las neoplasias derivaran de lesiones inflamatorias de las cuales podían ser diferenciadas ya que sostenía que "son más negras que una inflamación común y no son calientes; las venas son más grandes y más extendidas por que el humor (bilis negra) que causa el cáncer no fluye fácilmente alrededor debido a su viscosidad" (Trinchieri, 2012; Reedy, 1975). El término cáncer fue originalmente aplicado por Galeno para designar a ciertos tumores inflamatorios de mama en donde las venas superficiales se mostraban hinchadas, dibujando estructuras semejantes a las "pinzas de un cangrejo". En 1863, Virchow (Balkwill y Mantovani, 2001) describió "un infiltrado linfocitario" en tumores e interpretó que éstos eran un reflejo del origen del cáncer en sitios de inflamación crónica, por lo cual propuso formalmente una conexión entre inflamación y cáncer. Un siglo más tarde, Dvorak observó que la inflamación y cáncer comparten muchas características como la angiogénesis y el infiltrado inflamatorio (linfocitos -Li-, macrófagos -Mφ- y mastocitos) (Dvorak, 1986). En los últimos años, se han acumulado evidencias que permiten postular que la injuria crónica puede resultar en una cicatrización anormal que finalmente promovería la tumorigénesis, dando la idea que los "tumores son heridas que no sanan", la antigua hipótesis de Dvorak, todavía válida en el tiempo (Trinchieri, 2012).

Por otro lado, hay numerosas evidencias de que el sistema inmune puede contribuir a eliminar y/o controlar la expansión de las células transformadas. La profundización del conocimiento de cómo funcionan las distintas ramas del sistema inmune innato y adaptativo, de los mecanismos moleculares involucrados en los procesos inflamatorios sumados al advenimiento de técnicas como la citometría de flujo, la inmunohistoquímica y la biología molecular (que permitieron una mayor caracterización funcional del infiltrado leucocitario presente en tumores sólidos) permitieron discernir el complejo diálogo entre sistema inmune y cáncer. A grandes rasgos, se podría simplificar diciendo que algunos componentes del sistema inmune pueden ser considerados factores capaces de promover la iniciación, promoción y progresión del cáncer y además que pueden actuar paralizando otros mecanismos inmunológicos claves para efectuar la destrucción del tumor. Es por eso necesario diferenciar los actores celulares y moleculares críticos que participan en una "inflamación crónica" de los que participan en la "inmunidad antitumoral". El gran desafío actual consiste en promover las facetas antitumorigénicas del sistema inmunológico y lograr así que éste contribuya eficientemente a la eliminación del tumor.

■ EVASIÓN DEL SISTEMA INMUNE: UN NUEVO RASGO DISTINTIVO DEL CÁNCER

El foco de la investigación en cáncer en los últimos 50 años, se había centralizado en discernir las modificaciones intrínsecas en la habilidad de replicarse de la célula que se generan a partir de sucesivas mutaciones somáticas o modificaciones epigenéticas que repercuten en la evolución del tumor. En el año 2000, Douglas Hanahan y Robert A.

Weinberg, resumieron una enfermedad tan compleja como el cáncer en seis características que debiera adquirir una determinada célula para generar una transformación a célula neoplásica. Estas seis características del proceso neoplásico son compartidas por cualquier tipo de célula, independientemente de su origen embrionario o del tejido u órgano al cual ella pertenezca y son entonces, comunes a la increíble diversidad de enfermedades neoplásicas. Los primeros de estos cuatro rasgos esenciales en un proceso de transformación maligna son aquellos relacionados con: (1) el sostenimiento de una señal proliferativa; (2) la evasión de mecanismos supresores o inhibidores de la replicación celular; (3) la resistencia a la muerte; (4)

la permisividad para la inmortalidad replicativa. Las dos características restantes: (5) inducción de angiogénesis y (6) activación de la invasión y la metástasis, ejemplifican la adquisición de habilidades que le van a permitir a la célula tumoral crecer y diseminarse mediante la modificación del microambiente (Hanahan y Weinberg, 2000). (Figura 1)

En los últimos años, hubo un importante cambio en la forma de abordar el problema y se comenzó a trabajar en la noción de que los tumores malignos son más que una masa de células transformadas proliferando indefinidamente, sino que más bien son tejidos complejos formados por múltiples y heterogéneos tipos celulares que participan inte-

raccionando entre ellos mismos. Así, tanto el estroma asociado al tumor como también las células reclutadas al mismo son participantes activos en el proceso de tumorigénesis y no sólo testigos pasivos de este proceso. En la actualidad, existe consenso de que para entender la biología tumoral no sólo deben considerarse las nuevas habilidades que adquiere una célula en el proceso de transformación maligna (que involucran las seis características ya descritas) sino también comprender el microambiente tumoral. Once años después de haberse descrito los seis atributos distintivos del proceso neoplásico se reformulan estos postulados agregando dos nuevos rasgos fundamentales a la biología del cáncer. Estos dos nuevos rasgos que

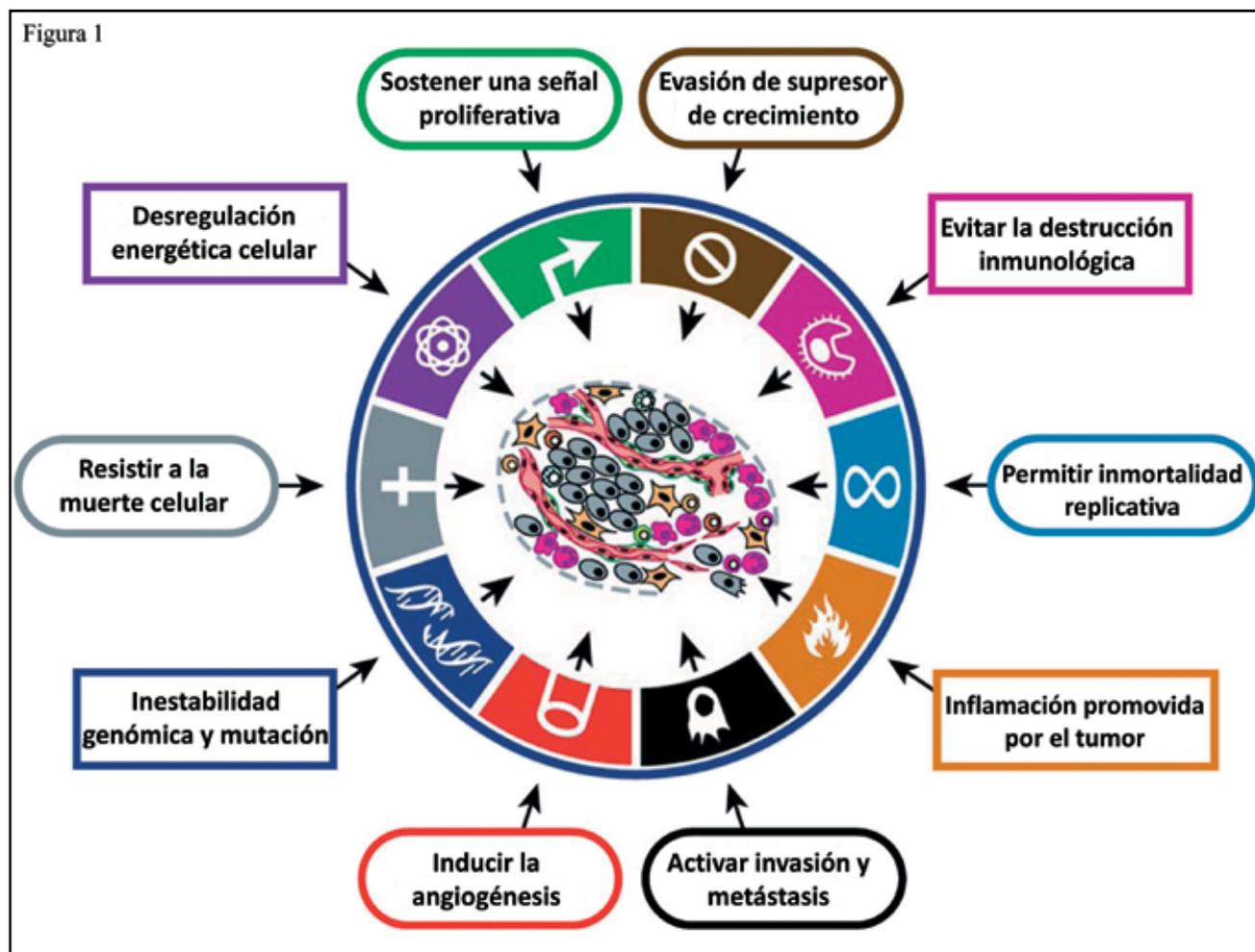


Figura 1. Las características del cáncer ("The hallmarks of cancer"). (Imagen extraída de Hanahan y Weinberg, Cell, 2011).

completan la enumeración anterior son: 7) la capacidad de reprogramar el metabolismo energético (aumento de glicólisis y captación de glucosa) y (8) la capacidad de las células neoplásicas de evadir su destrucción por parte del sistema inmune (Hanahan y Weinberg 2012) (Figura 1)

Si bien el daño causado por las células transformadas o mutadas puede ser letal existen numerosos mecanismos moleculares, denominados "supresores de tumores", que pueden ser intrínsecos o extrínsecos y que previenen que estas células sigan reproduciéndose y desarrollen un tumor maligno. Los mecanismos supresores intrínsecos están constituidos por componentes moleculares normalmente presentes dentro de las células sanas y son los responsables de desencadenar fenómenos tales como la senescencia, reparación o apoptosis para prevenir la transformación celular. En cuanto a los mecanismos supresores extrínsecos, éstos corresponden a mecanismos moleculares externos a la célula que detectan la presencia de células cancerosas y se activan para restringir su crecimiento (Vesely y col., 2011).

Una variedad de mecanismos moleculares intrínsecos supresores de tumor intentará producir la reparación de mutaciones génicas. En caso de que estos primeros mecanismos de reparación fallen, se activarán los procesos que darán lugar a la senescencia o apoptosis. La senescencia celular corresponde a un estado caracterizado por un arresto en el ciclo celular y es inducido por numerosas proteínas celulares (como por ejemplo la proteína p53) que pueden reconocer daños en el genoma causados por ejemplo por lesiones mutagénicas. Además, la senescencia celular es desencadenada por la activación de oncogenes tales como Ras (Xu y col., 2007; Se-

rrano y col., 1997). La respuesta a un estrés celular, la injuria o la falta de señales de supervivencia, como así también las alteraciones en la integridad de la mitocondria, generan como resultado una liberación de efectores proapoptóticos que desencadenan la muerte celular por activación de enzimas específicas denominadas caspasas (Danial y col., 1994). En términos generales, tanto la senescencia como la apoptosis impedirán la capacidad adquirida de estas células mutadas a proliferar y actúan como una barrera potente para el desarrollo posterior de cualquier célula pre-neoplásica. Sin embargo, cuando estos mecanismos no son suficientes para controlar el crecimiento tumoral se desencadena una respuesta inmune específica.

Al menos tres mecanismos supresores tumorales extrínsecos por los que las células y tejidos adyacentes detectan la presencia de células cancerosas han sido identificados. Todos ellos impiden que las células cancerosas invadan y se extiendan a otros tejidos en el huésped. El primero de los mecanismos se basa en la dependencia obligatoria de las células neoplásicas a señales tróficas específicas del microambiente. Cuando se rompen estas señales, tales como las producidas por células epiteliales-matriz extracelular, resulta en muerte celular. Un segundo mecanismo parece implicar la conexión entre genes involucrados en polaridad celular que controlan uniones celulares y la proliferación, previniendo la progresión del ciclo celular al encontrarse desregulados los complejos de unión. Por último, el tercer mecanismo supresor tumoral extrínseco relaciona la limitación en la transformación y el crecimiento tumoral por leucocitos efectores del sistema inmune (Vesely y col., 2011).

Por lo tanto, el sistema inmune

tiene tres roles fundamentales en la prevención de tumores malignos pudiendo los dos primeros ser considerados como mecanismos indirectos. Por un lado, el sistema inmune protege al organismo de neoplasias inducidas por virus al suprimir las correspondientes infecciones virales. Además, es responsable de la eliminación eficiente y a tiempo de patógenos con una pronta resolución de la respuesta inflamatoria, lo cual evita el establecimiento de un ambiente inflamatorio crónico que, como veremos más adelante, es un fuerte promotor de la tumorigénesis. Finalmente, el sistema inmune puede específicamente identificar y eliminar células tumorales que expresen antígenos específicos de tumor (TSAs). Este proceso, denominado "inmunovigilancia" ocurre cuando el sistema inmune identifica células transformadas que han escapado a los mecanismos intrínsecos supresores de tumor y pueden así generar un tumor maligno (Schreiber, 2011; Dunn y col., 2002). Las células efectoras del sistema inmune emplean diversos mecanismos para controlar y eliminar a esas células mutadas y es por eso que es considerado el tercer mecanismo supresor tumoral extrínseco. Así, la habilidad de evadir la inmunovigilancia ha sido incluida como un nuevo rasgo distintivo del cáncer.

En esta revisión, nos focalizaremos en datos que apoyan la conclusión de que el sistema inmune puede actuar como un mecanismo supresor de tumor extrínseco, pero que paradójicamente también puede promover la iniciación, promoción y progresión del cáncer.

■ INMUNIDAD INNATA Y ADQUIRIDA FRENTE AL CÁNCER

La primera rama del sistema inmune en activarse frente a la entrada de un agente extraño o agresor son

las células y mediadores del denominado sistema inmune innato. Las células de la inmunidad innata poseen receptores cuya distribución no es clonal (todas las células de un mismo linaje expresan los mismos receptores). Algunas poblaciones celulares consideradas como parte de la inmunidad innata son los M ϕ , neutrófilos, monocitos, otras células polimorfonucleares, células mieloides supresoras, etc. Dentro del sinnúmero de mediadores solubles más característicos que participan en esta etapa, se encuentran algunas de las citoquinas pro-inflamatorias más conocidas: la interleuquina (IL)-1 la IL-6, factor de necrosis tumoral (TNF) - α , etc. La activación de las células de la inmunidad innata frente a una situación de daño (infecciosa o estéril) es inmediata y crucial en el desencadenamiento de un fenómeno inflamatorio. En contraste, la inmunidad adaptativa comprende principalmente a los Li B y T, cuyos receptores antigénicos son el resultado del proceso de recombinación somática y por lo tanto su distribución es clonal: cada Li tiene un receptor específico diferente. La inmunidad adaptativa genera una respuesta específica contra antígenos en particular, algo más demorada y conduce a la memoria inmunológica o **inmunidad**. La activación de la inmunidad innata es fundamental para que se inicie la activación de la adaptativa y esta última, si se desregula, contribuye a la perpetuación de un estado inflamatorio crónico.

Tanto la inmunidad innata como la adaptativa pueden contribuir en la eliminación del tumor. Las células citotóxicas naturales (*natural killer* o NK) y las células T CD8⁺ o células citotóxicas son algunas de los principales protagonistas en la eliminación de células tumorales. Citoquinas tales como el interferón (IFN)- γ y la IL-12, identificadas generalmente con células T cooperadoras tipo I

(Th1), raramente matan a las células cancerosas directamente pero son requeridas para la activación de las células NK y los Li T CD8⁺ citotóxicos. Sin embargo, el análisis exhaustivo del infiltrado leucocitario en tumores sólidos o en sangre en pacientes (como así también en modelos experimentales de cáncer) demostró que la funcionalidad de las células presentes no siempre corresponde a la esperada para combatir un tumor. En cambio, las poblaciones celulares predominantes son M ϕ asociados a tumor (TAMs), células mieloides supresoras, neutrófilos y células T regulatorias, todas ellas compatibles con una respuesta antitumoral inhibida e ineficiente. Por el contrario, trabajos muy interesantes realizados en pacientes con cáncer colorectal establecieron una correlación significativa entre la presencia intratumoral de células T CD8⁺ y moléculas asociadas a su actividad (tales como IFN- γ y granzima B) y el tiempo libre de enfermedad y supervivencia de esos pacientes (Galon y col., 2006), indicando que cuando se potencia la rama del sistema inmune adecuado éste puede contribuir al control del proceso neoplásico.

En la actualidad se sabe que tanto las células de la inmunidad innata como los Li T y B a su vez se pueden diferenciar fenotípica y funcionalmente en una miríada de subpoblaciones con distintos roles, incluso muchas veces antagónicas, tanto para la defensa contra agentes extraños como en la inmunidad antitumoral (Tabla 1). Es por eso que sólo recientemente, con los nuevos avances tecnológicos, se logró identificar qué subpoblaciones son funcionalmente importantes y cuáles no en la defensa antitumoral. Un ejemplo paradigmático de la dualidad de funciones que puede ejercer una determinada subpoblación celular son los M ϕ . Si bien está demostrado que los tumores están infiltrados por di-

versas poblaciones celulares del sistema inmune tales como M ϕ , células NK, LiT regulatorios, Li B, LiTh1 y Th2, LiT senescentes, LiT exhaustos etc, los M ϕ representan una de las poblaciones más abundantes en el microambiente tumoral. Los M ϕ pueden presentar diferentes estados de activación y se los ha clasificado como M ϕ activados en forma clásica o M1, y M ϕ activados en forma alternativa o M2. En cada uno de estos estados de polarización, los M ϕ adquieren un fenotipo característico y sintetizan citoquinas, quimioquinas y factores que complementan su identificación. Los M1 se caracterizan por secretar citoquinas pro-inflamatorias como TNF- α , IL-1 β , IL-6 y por la alta expresión de IL-12. Además, producen óxido nítrico (NO), especies reactivas del oxígeno (ROS) y quimioquinas que atraen a Li Th1. Los M2 se caracterizan por la baja expresión de IL-12 y la alta producción de IL-10 y de IL-1RA, entre otras. Además, los M2 producen un perfil de quimioquinas distinto a los M1 (Pollard, 2004). Estos estudios demuestran la heterogeneidad y la plasticidad funcional que presentan los M ϕ . En general, los TAM humanos o murinos generalmente presentan un perfil tipo M2 y secretan un número de factores de crecimiento y citoquinas proangiogénicas tales como VEGF, TNF- α , IL-8 y bFGF, y enzimas que promueven los procesos metastásicos tales como las metaloproteinasas MMP-2, MMP-7, MMP-9 y MMP-12 (Pollard, 2004). De lo expuesto anteriormente se deduce que los TAM presentan distintos perfiles de activación y que de acuerdo a ello adquirirán funciones pro- o anti-inflamatorias, modulando fuertemente la inmunidad antitumoral y la progresión del tumor.

Una situación de dualidad similar se observa para muchas otras poblaciones celulares y se conoce que la funcionalidad adoptada por las

Tabla 1. Rol de los diferentes subtipos de células inflamatorias y del sistema inmune en la inmunidad antitumoral y en la inflamación promovida por el tumor (Adaptado de Grivennikov y col. Cell. 2010).

TIPO CELULAR	ROL ANTITUMORAL	ROL PROTUMORAL
Macrófagos (Mφ) y células dendríticas (CDs)	Presentación antigénica; producción de citoquinas (IL-12 e IFNs tipo I).	Inmunosupresión; producción de citoquinas, quimioquinas, proteasas, factores de crecimiento y factores angiogénicos.
Mastocitos		Producción de citoquinas.
células B	Producción de anticuerpos específicos contra antígenos tumorales?	Producción de citoquinas y anticuerpos; activación de mastocitos; inmunosupresión.
Li T CD8+	Lisis directa de células cancerosas; producción de citoquinas citotóxicas.	Producción de citoquinas?
Li CD4+ Th2		Educación de macrófagos; producción de citoquinas; activación de células B.
Li CD4+ Th1	Colaboración con Li T citotóxicos (CTLs) en el rechazo del tumor; producción de citoquinas (IFNγ).	Producción de citoquinas.
Li CD4+ Th17	Activación de Li T citotóxicos (CTLs).	Producción de citoquinas.
Li CD4+ Treg	Supresión de la inflamación (citoquinas y otros mecanismos supresores).	Inmunosupresión; producción de citoquinas.
células NK y NKT	Citotoxicidad directa contra células cancerosas; producción de citoquinas citotóxicas.	
células mieloides supresoras (MDSCs)		Inmunosupresión; producción de citoquinas, quimioquinas, proteasas, factores de crecimiento y factores angiogénicos.
Neutrófilos	Citotoxicidad directa; regulación de la respuesta CTL.	Producción de citoquinas, proteasas y ROS.

células en el microambiente tumoral está comandada por las interacciones de las distintas células de sistema inmune con factores secretados por las propias células tumorales y otras células que conviven en el microambiente tumoral.

■ INMUNOEDICIÓN: LA TEORÍA DE LAS 3 E.

En 1909 Paul Ehrlich propuso por primera vez la idea de que el sistema inmune podía protegernos frente al cáncer. Posteriormente, en 1957 Burnet y Thomas propusieron la hipótesis de la "inmunovigilancia", de acuerdo a la cual el sistema inmunológico sería capaz de detectar y eliminar células transformadas antes de que el tumor pueda crecer lo suficiente y evidenciarse clínica-

mente. Esta etapa de **eliminación** es un ejemplo claro de inmunovigilancia tumoral en la cual moléculas y células tanto de la inmunidad innata como de la inmunidad adaptativa trabajan juntas para detectar la presencia de un tumor en desarrollo o de células transformadas. Sin embargo, muchas veces las células tumorales no son completamente eliminadas e ingresan a una fase de **equilibrio** donde el sistema inmune controla transitoriamente el crecimiento tumoral. En esta fase, el sistema inmune del huésped y las células tumorales entran en un balance dinámico en el cual el sistema inmune controla el crecimiento pero es incapaz de erradicar una población heterogénea de las células neoplásicas que adquirieron la forma de evadir el sistema inmune. Dicho de otra

manera, el sistema inmune elimina la población de células neoplásicas más inmunogénicas, permitiendo la supervivencia de aquellos clones que adquirieron la capacidad de evadirlo (inmunoselección). El sistema inmune adaptativo es el responsable del mantenimiento de esta fase (Koebel y col., 2007). Finalmente, cuando el sistema inmune falla, tanto en la eliminación o el control de las células transformadas, permite la supervivencia de estas células tumorales para que crezcan de manera no restringida y de esta forma se alcanza la etapa de **escape** (Rabinovich y col., 2007) (Figura 2). Estos tres procesos que funcionan en forma independiente o en secuencia se conocen como "Inmunoección del cáncer" ("*cancer immunoediting*", Schreiber y col., 2011).

Por lo tanto, una vez que el tumor es clínicamente aparente y es removido quirúrgicamente, es fun-

damental reforzar al sistema inmune adaptativo con el objeto de promover la fase de eliminación y generar

células T CD8⁺ citotóxicas y productoras de IFN- γ que puedan evitar posibles recidivas.

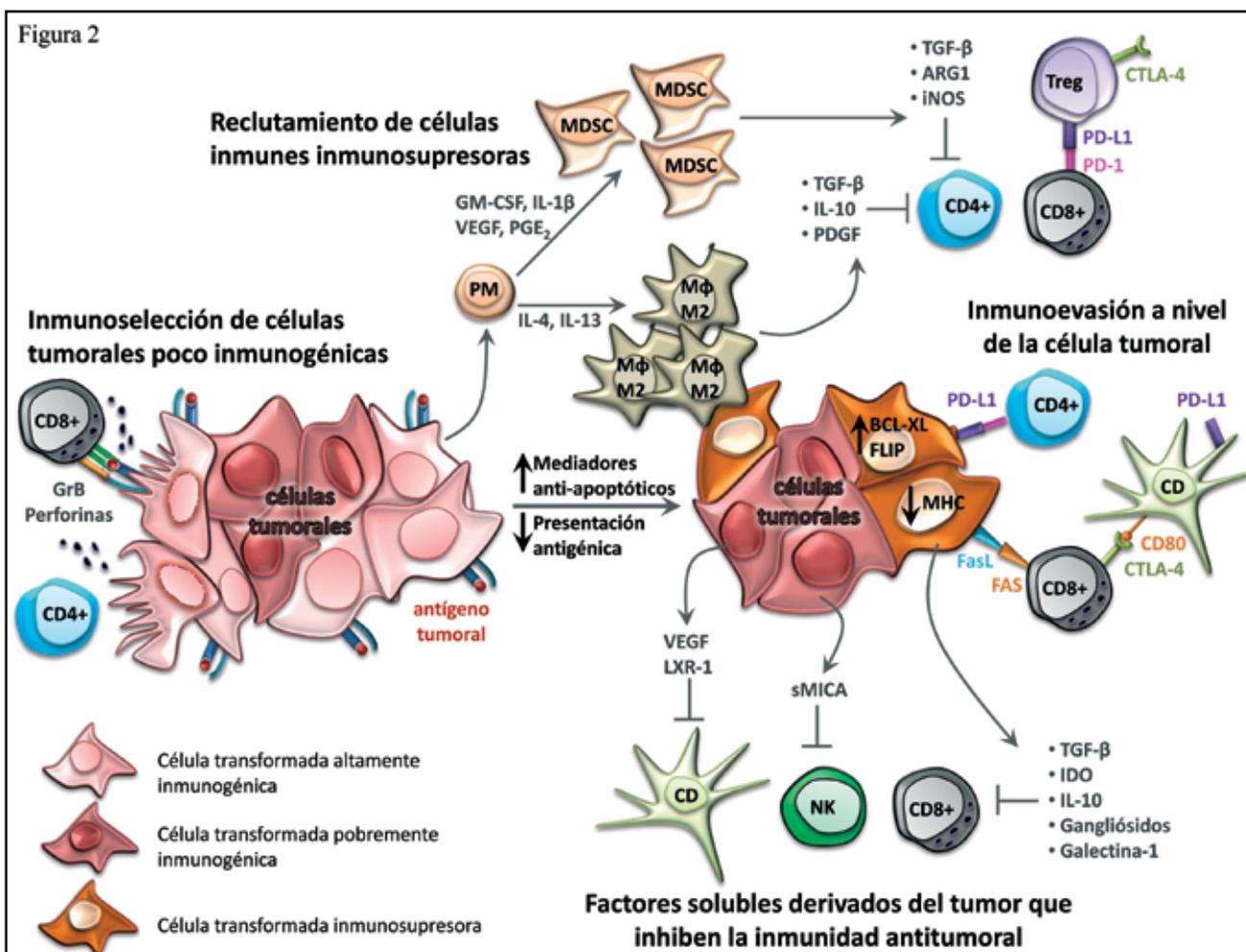


Figura 2. Mecanismos de escape tumoral. El sistema inmune ejerce presión selectiva en el tumor a través de una variedad de procesos, incluyendo la destrucción de células tumorales antígeno positivas por parte de linfocitos T CD8⁺. Como resultado, las células tumorales más inmunogénicas son eliminadas, permitiendo que las células tumorales variantes vecinas sean más aptas y puedan evadir la destrucción mediada por el sistema inmune (inmunoselección). Con el tiempo, los tumores evolucionan mecanismos para evadir o inhibir la inmunidad tanto por mecanismos intrínsecos o extrínsecos. Alteraciones intrínsecas propias de las células tumorales permiten evadir la respuesta inmune mediante la disminución de la presentación de antígenos (MHC), sobreexpresión de inhibidores de la apoptosis (Bcl-XL, FLIP), o expresión en la superficie de moléculas inhibitorias que destruyen directamente a las células T citotóxicas (PD-L1, FasL). Además, las células tumorales secretan factores que inhiben funciones efectoras de células inmunes (TGF- β , IL-10, VEGF, LXR-L, IDO, gangliósidos, galectina 1 o MICA soluble), o reclutan células regulatorias que generan un microambiente inmunosupresor (IL-4, IL-13, GM-CSF, IL-1 β , VEGF, o PGE₂). Una vez reclutadas, las células regulatorias atenúan la inmunidad antitumoral mediante la liberación de citoquinas inmunosupresoras y alteraciones en el contenido de nutrientes del microambiente. Específicamente, la secreción de IL-4 e IL-13 conduce al reclutamiento y la polarización de macrófagos M2 a partir de precursores mieloides, los cuales secretan TGF- β , IL-10 y PDGF que inhiben a células T. La liberación de factores estimulantes de colonias, IL-1 β , VEGF, o PGE₂ resulta en la acumulación de células mieloides supresoras (MDSC), quienes bloquean la función de linfocitos T mediante TGF- β , ARG1 e iNOS. Las células T regulatorias también pueden inhibir a células T efectoras a través de múltiples mecanismos, incluyendo la expresión de CTLA-4 (Imagen adaptada de Vesely MD y col. *Annu Rev Immunol.* 2011).

■ INFLAMACIÓN: CAUSA O CONSECUENCIA DEL CÁNCER?

La idea de que existe una relación entre injuria tisular y cáncer no es nueva. Esta hipótesis ha ganado importancia en investigaciones que revelan una fuerte asociación entre injuria crónica y la subsecuente tumorigénesis en ese sitio (Figura 3). Por ejemplo, el abuso de alcohol y las infecciones crónicas con virus de hepatitis B y C, producen una injuria sostenida en el hígado e incrementan el riesgo de carcinoma hepatocelular. El tabaquismo y la exposición a partículas de polvo de sílica, causan daño en el esófago y pulmón y promueven el desarrollo de cáncer en esos tejidos mientras que la infección crónica con *Helicobacter pylori* está asociada a gastritis y cáncer de estómago (El-Serag y Rudolph, 2007; Hecht, 2002; Uemura y col., 2001). Algunas de las hipótesis de que la injuria tisular promovería la tumorigénesis están basadas en las fuertes similitudes entre características claves de la cicatrización y desarrollo tumoral. En ambos procesos hay una poderosa activación de células madre, proliferación celular, inflamación y angiogénesis. Por lo tanto, es tentador postular que la injuria crónica puede resultar en una cicatrización anormal que finalmente promueve la expansión y progresión de la tumorigénesis. En otras palabras, si el proceso inflamatorio no es resuelto o es crónicamente provocado por injuria repetitiva o sostenida u otros factores puede dar como resultado un proceso de cicatrización descontrolado que promueve la formación del cáncer.

Estudios epidemiológicos han revelado que la inflamación crónica predispone a diferentes formas de cáncer. En contraste, el uso de anti-inflamatorios no esteroideos están asociados con protección contra diferentes tipos de tumores. El com-

ponente inflamatorio está presente en el microambiente de la mayoría de los tejidos neoplásicos. Muchas de las características claves del cáncer relacionado con la inflamación incluyen la infiltración de los leucocitos, principalmente los TAM, la presencia de citoquinas pro-inflamatorias como TNF- α , IL-6, IL-1 β y quimioquinas como CCL2 y CXCL8. La presencia de estas citoquinas pro-inflamatorias conlleva la activación de factores cruciales involucrados en la inflamación relacionada al cáncer tales como los factores de transcripción NF- κ B y STAT3 (Balkwill y col., 2001; Coussens y col., 2002; Balkwill y col., 2005; Mantovani y col., 2008).

NF- κ B es un orquestador clave de la inmunidad innata e inflamación y una regulación anormal del mismo ha sido observada en muchos tipos de cánceres (Karin, 2006). NF- κ B induce la expresión de citoquinas inflamatorias, moléculas de adhesión, ciclooxigenasa 2 (COX-2), óxido nítrico sintetasa, óxido nítrico (NO) y factores angiogénicos. Además, induce la expresión de genes anti-apoptóticos como Bcl-2, que promueve la supervivencia de las células tumorales. Por ejemplo se ha observado que una inactivación específica del NF- κ B en leucocitos infiltrantes de tumor (a través de I κ B-quinasa β) inhibe el cáncer asociado a colitis (Colotta y col., 2009).

Estos factores contribuyen al reclutamiento de células inflamatorias infiltrantes de tumor mediante el control de la producción de factores quimiotácticos en la célula tumoral y la expresión de receptores de quimioquinas por parte de las células hematopoyéticas (Trinchieri, 2012). Células mieloides que expresan STAT3 fallan en diferenciarse a células efectoras antitumorales. Estas células mieloides producen menores niveles de IL-12, una citoquina

pro-inflamatoria inductora de una respuesta de Lin⁺T colaboradores tipo 1 (Th1) con capacidades antitumorales. STAT3 favorece la inducción de M ϕ activados por la "vía alternativa" con claros efectos pro-tumorigénicos (El Kasmí y col., 2007; Yu y col., 2007). Muchos factores liberados por el tumor y células estromales tumorales, tales como VEGF, IL-6, IL-10, e IL-23, activan STAT3 en células tumorales y estromales. Además, muchos de estos factores son transcripcionalmente regulados por STAT3 generando un circuito de retroalimentación positiva que contribuye a la creación del ambiente inmunosupresor (Yu y col., 2007).

Otro aspecto fundamental en un proceso inflamatorio es el daño mitocondrial y las especies reactivas del oxígeno (ROS) los cuales juegan un rol principal en respuesta al daño tisular. En condiciones de cronicidad, las ROS producen daños en el DNA, la activación de oncogenes y la expresión de genes proinflamatorios (Kamp y col., 2011; Naik y col., 2011). Por otro lado, el daño tisular secundario asociado a hipoxia y estrés nutricional, dos situaciones observadas en la mayoría de los tumores sólidos, causa una producción elevada de ROS (Wellen y Thompson, 2010) que puede promover mayor crecimiento tumoral cuando las células transformadas superan y escapan a la senescencia y muerte celular inducida por daño oxidativo (Ralph y col., 2010). La producción de ROS mitocondrial es requerida para la transformación maligna de células mediada por c-MYC, K-Ras y la vía de señalización WNT (KC S y col., 2006; Weinberg y col., 2010; Yoon y col., 2010).

Además de las ROS, las especies reactivas del nitrógeno (RNS) producidas por células inflamatorias inducen daños patológicos y un estado pro-oxidativo que puede promover

iniciación y crecimiento del cáncer (Schetter y col., 2010). Al igual que las ROS, las RNS pueden inducir mutaciones en el DNA en proto-oncogenes, genes supresores tumorales y otros genes que codifican proteínas que controlan la apoptosis, la supervivencia y la reparación del DNA. Tanto las ROS como las RNS reducen la expresión y la actividad enzimática de factores reparadores de ADN, tales como mutL y mutS (Colotta y col., 2009).

■ EL PROPIO CÁNCER COMO INDUCTOR DE INFLAMACIÓN

La mayoría de los tumores sólidos desencadenan una respuesta inflamatoria intrínseca que promueve un

ambiente pro-tumorigénico (Mantovani y col., 2008) (Figura 3). Además, ciertos oncogenes, tal como la familia de los genes *RAS* y *MyC*, inducen un programa transcripcional que conduce a la remodelación del microambiente tumoral a través del reclutamiento de leucocitos mediante la liberación de quimioquinas y citoquinas y la inducción de un cambio angiogénico. Todos los tumores sólidos en un determinado momento carecen de un buen suministro de sangre y quedan privados de oxígeno y nutrientes. Esto conlleva a una importante muerte por necrosis, principalmente en el núcleo tumoral, por lo cual se liberan mediadores inflamatorios tales como IL-1 y HMGB1 (Grivennikov y col., 2010).

La respuesta inflamatoria subsiguiente promueve la angiogénesis y la supervivencia de las células tumorales con factores de crecimiento adicionales producidos por células inflamatorias reclutadas (Kim y col., 2009).

Finalmente, una fuerte respuesta inflamatoria puede ser iniciada por la terapia tumoral. La radiación y la quimioterapia causan una masiva necrosis de las células tumorales y células que rodean al tumor lo cual desencadena una respuesta inflamatoria (Zong y Thompson, 2006). El resultado neto de una inflamación inducida por terapia es controversial ya que por un lado puede tener funciones que promueven el creci-

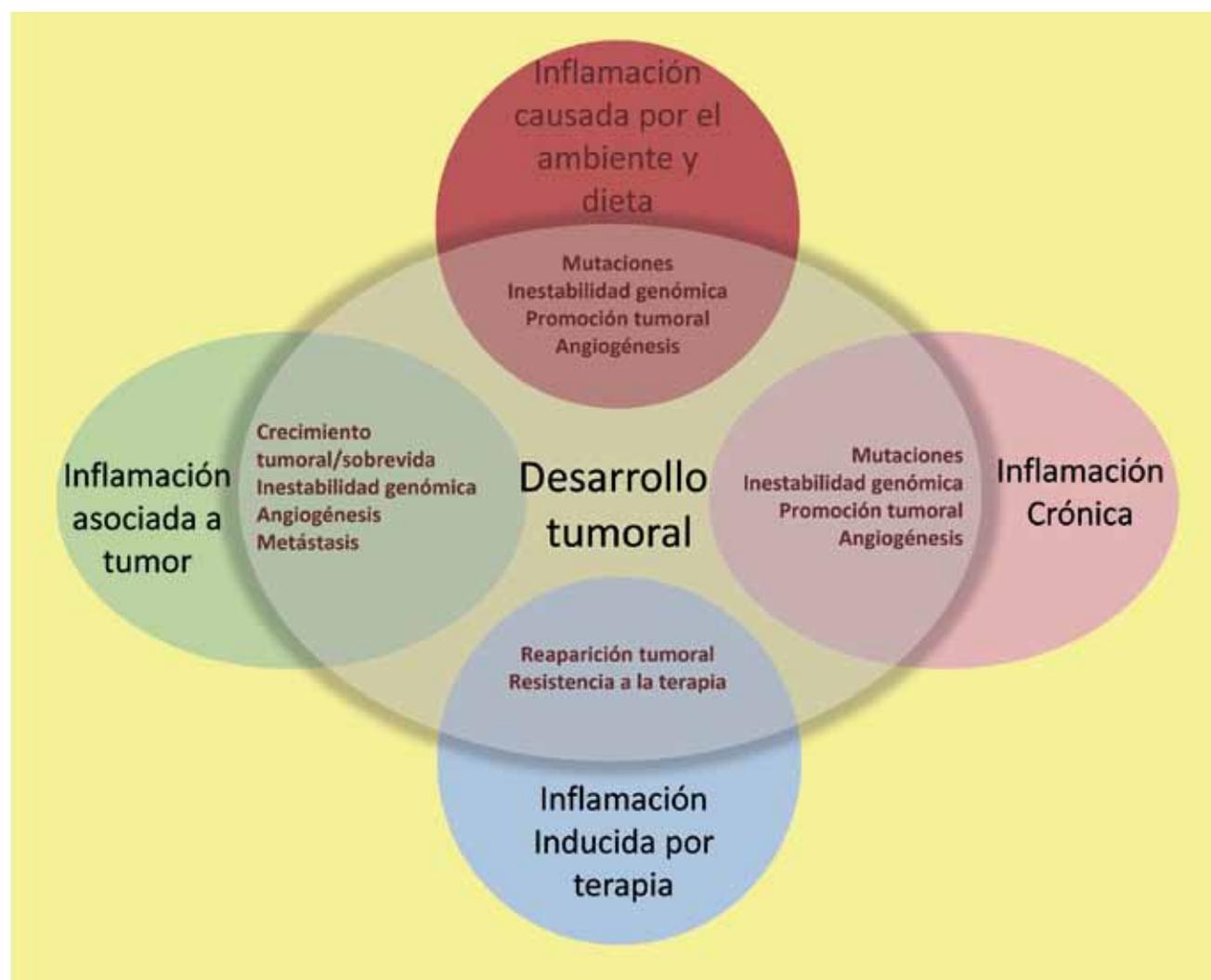


Figura 3. Tipos de inflamación en tumorigénesis y cáncer. (Imagen extraída de Grivennikov y col. Cell. 2010)

miento tumoral debido a la masiva necrosis pero, por otro lado, puede promover una presentación cruzada de antígenos tumorales y la subsecuente inducción de una respuesta inmune antitumoral (Zitvogel y col., 2008) (Figura 3).

■ INMUNOTERAPIA Y CÁNCER

Durante las últimas dos décadas, el paradigma para el tratamiento de cáncer ha evolucionado desde agentes citotóxicos no específicos hasta tratamientos selectivos. La quimioterapia contra el cáncer está basada en el uso de compuestos que matan rápidamente a células en constante división. Estas drogas continúan siendo la columna vertebral de los actuales tratamientos pero ellos están limitados por las altas toxicidades y la frecuente resistencia adquirida por parte de las células tumorales. La identificación de más de 100 antígenos específicos en cánceres humanos, incluyendo productos de genes mutados, antígenos *testis* (antígenos que son normalmente expresado por células germinales y no en células adultas que se vuelven a expresar en algunos tipos de tumores) y productos virales ha permitido el desarrollo de la inmunoterapia antígeno-específica. Otros ensayos han intentado expandir *ex vivo* a los Li T antígeno-específicos para luego ser reintroducidas en el paciente. Además, a través de la vacunación con antígenos específicos junto con un adyuvante se puede generar Li T antígeno-específicos *in vivo* y de esta forma erradicar numerosos tumores (Palucka y Banchereau, 2012; Restifo y col., 2012). El desarrollo de novedosas terapias mediante el uso de células NK y NKT en inmunoterapias tumorales ha contribuido a favorecer el entendimiento de las propiedades efectoras de estas células (Vivier E y col. 2012).

El uso de anticuerpos monoclo-

nales específicos para antígenos tumorales es, sin duda, la inmunoterapia de mayor éxito en los últimos años. Estos anticuerpos constituyen un novedoso tratamiento para determinados tipos de tumores como por ejemplo linfomas y tumores sólidos (Scott AM y col. 2012). Por ejemplo, trastuzumab (Herceptin®) que se utiliza para el tratamiento del cáncer de mama y cetuximab (Ervitux®) para el tratamiento del cáncer de colon son anticuerpos específicos que se unen respectivamente a proteínas HER2/neu y EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico) que se encuentran sobre-expresados en células tumorales bloqueando las señales de crecimiento inducidas por estos receptores y frenando la proliferación de las células tumorales. El bevacizumab (Avastin®) es un Ac monoclonal que se utiliza en la terapia para cáncer de mama, pulmón y colon. Este Ac se une de forma selectiva a VEGF que se localiza en las paredes de los vasos sanguíneos y linfáticos del organismo. El VEGF es necesario para que los vasos sanguíneos crezcan dentro del tumor ya que lo suplen con nutrientes y oxígeno. Cuando el bevacizumab se une al VEGF bloquea su función previniendo el crecimiento del tumor al bloquear el crecimiento de los vasos sanguíneos que aportan los nutrientes y oxígeno necesarios para el mismo.

Otros tipo de inmunoterapia recientemente aprobada por la FDA (Food and Drug Administration de EE.UU) es la que promueve el uso de anticuerpos bloqueantes de señales que inhiben a las células T efectoras encargadas de matar las células neoplásicas tales como CTLA-4 y PD1. De esta forma se favorece una señal sostenida por parte de los Li T efectores (Pardoll DM. 2012). El ipilimumab (anticuerpo anti-CTLA-4) ha sido aprobado para su uso como terapia de primera o de segunda lí-

nea para el tratamiento de pacientes con melanoma avanzado, lo cual mejora la supervivencia global en comparación con los protocolos estándar y, sobre todo, logra beneficios duraderos (más de 2,5 años) para un 15 a 20% de los pacientes tratados (Mellman y col., 2011).

Otra estrategia de inmunoterapia es a través de la vacunación, es decir, la provisión de un antígeno tumoral junto con un adyuvante para estimular Li T específicos de tumor *in vivo* y de esta forma erradicar numerosos tumores (Palucka K y Banchereau J, 2012; Restifo NP y col. 2012). Numerosos ensayos clínicos en diferentes fases de experimentación se están llevando a cabo para el tratamiento de melanoma, cáncer colorectal, renal, de ovario, de mama, de pulmón, de próstata y leucemias utilizando como fuente de antígenos células tumorales autólogas o alogénicas y antígenos tumorales específicos (péptidos específicos, lisado de células tumorales, proteínas recombinantes) junto con GM-CSF como adyuvante. Dentro de las vacunas contra el cáncer, aparecen como las más prometedoras las vacunas a base de células dendríticas (CDs). Debido a sus propiedades únicas para activar Li T se han convertido en los blancos naturales para la administración de antígenos tumorales para la activación de Li T específicos de tumor con fines terapéuticos (Palucka y Banchereau, 2012). Por ejemplo, Sipuleucel-T ha sido recientemente aprobado por la FDA para su uso en pacientes con cáncer de próstata metastásico resistente a la castración. Esta vacuna a base de CDs autólogas tiene como objetivo estimular a los Li T específicos contra la fosfatasa ácida prostática (PAP), una proteína que se sobre-expresa en el carcinoma de próstata. Aunque el principio de acción de Sipuleucel-T permanece poco estudiado, el tratamiento con esta vacuna aumenta la

media de supervivencia en 4 meses con una toxicidad mínima (Martin y col., 2011).

Existen también terapias no específicas cuyo objetivo es estimular células del sistema inmune para reforzar la respuesta inmune antitumoral. Por ejemplo los IFNs son agentes activadores de CDs utilizados en tratamiento de carcinoma de células renales, la IL-2 está involucrada en la expansión de células T y es utilizada en tratamientos de melanoma y carcinoma de células renales y los agonistas de receptores tipo Toll (*Toll like receptors, TLRs*) actúan como inmunomoduladores de la respuesta inmune activando principalmente a CDs (Andreani y col., 2007; Núñez y col., 2012; Gatti y col., 2013). Por ejemplo imiquimod, una agonista sintético específico para TLR7 y TLR8, es usado para el tratamiento superficial de carcinomas de células basales de la piel (Dunne y col., 2011). Muchos ligandos de TLRs están siendo testeados en pruebas clínicas, como por ejemplo el oligodesoxinucleótido CpG, un ligando de TLR9 (Duramad y col., 2005) y el ácido poliinosínico-policitidílico (poli I:C), ligando de TLR3 (Zhang y col., 2011).

■ CONCLUSIONES FINALES

El descubrimiento de vías moleculares cruciales que promueven el crecimiento y mantenimiento del tumor junto con el desarrollo de fármacos que inhiben específicamente estas vías ha iniciado una nueva era de la medicina del cáncer. Asimismo, una mejor comprensión de los mecanismos inmunes protectivos anti-tumor y la traducción de estos conceptos en inmunoterapias eficaces que prolongan la supervivencia del paciente ha validado la idea desde hace mucho tiempo que la inmunidad juega un importante rol en la patogénesis del cáncer. El modo

complementario de acción de estas dos modalidades prometedoras sugiere interesantes posibilidades de sinergia terapéutica con el tratamiento combinado, y se espera que den como resultado la regresión del tumor a largo plazo en los pacientes tratados.

■ ABREVIATURAS Y GLOSARIO:

Apoptosis: proceso de muerte celular programada como consecuencia de la pérdida de señales de supervivencia o la presencia de señales de muerte.

Angiogénesis: proceso que involucra la generación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes.

Arresto celular o quiescencia: proceso reversible por el cual una célula frena o bloquea su ciclo celular.

ARG1, arginasa 1.

CD, células dendríticas.

Célula madre: o célula troncal, es denominada aquella célula con capacidad de autorenovación y que puede diferenciarse originando distintos linajes celulares.

Ciclo celular: es un conjunto ordenado y secuencial de sucesos que conducen al crecimiento de la célula y la división en dos células hijas.

GM-CSF, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos.

GrB, granzima -B.

IDO, enzima indolamina 2,3-deoxigenasa.

IL, interleuquina.

iNOS, óxido nítrico sintasa inducible.

MDSC, célula mieloidesupresora.

MHC, complejo mayor de histocompatibilidad.

MICAs, secuencia relacionada a polipéptido MHC clase I -A soluble.

Modificaciones epigenéticas: regulaciones heredables de la ex-

presión génica que no implican cambios en la secuencia de nucleótidos.

Oncogen: es cualquier gen mutado con ganancia de función que codifica una proteína capaz de transformar células en cultivo o de inducir cáncer en animales de experimentación.

p53, factor de transcripción nuclear que se induce como consecuencia de daños en el ADN, activando enzimas de reparación, produciendo el arresto celular, apoptosis y senescencia.

PDGF, factor de crecimiento derivado de plaquetas

PD1, receptor de muerte celular programada.

PD-L1, ligando de PD -1.

PGE2, prostaglandina E-2.

Proapoptosis: estado reversible previo a la apoptosis.

Senescencia: es el proceso iniciado como respuesta al estrés y daño ocurrido en una célula y constituye una ruta alternativa de respuesta a la muerte celular programada.

TGF- β , factor de crecimiento transformante - β .

Treg, células T reguladoras.

TSA: abreviatura en inglés para "antígenos específicos de tumor".

VEGF, factor de crecimiento del endotelio vascular.

■ BIBLIOGRAFÍA

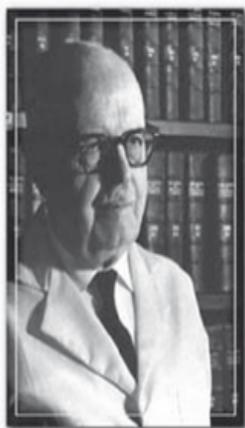
Aggarwal BB, Vijayalekshmi RV, Sung B. (2009) Targeting inflammatory pathways for prevention and therapy of cancer: short-term friend, long-term foe. *Clin Cancer Res.* 15: 425-30.

Andreani V, Gatti G, Simonella L, Rivero V, Maccioni M. (2007) Activation of Toll-like receptor 4 on tumor cells in vitro inhibits subsequent tumor growth in vivo. *Cancer Res.* 67:10519-27.

Balkwill F, Montovani. (2001) Inflammation and cancer: back to

- Virchow? *Lancet*. 357: 539–545.
- Balkwill F, Charles KA, Mantovani A. (2005) Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer Cell*. 7:211–217.
- Colotta, F., Allavena, P., Sica, A., Garlanda, C., and Mantovani, A. (2009) Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis*. 30: 1073–1081.
- Coussens LM, Werb Z. (2002) Inflammation and cancer. *Nature*. 420: 860–867.
- Danial NN, Korsmeyer SJ. (2004) Cell death: critical control points. *Cell*. 116:205–19
- Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. (2002) Cancer immunoeediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol*. 3: 991-8.
- Dunne A, Marshall NA, Mills KH. (2011) TLR based therapeutics. *Curr Opin Pharmacol*. 11: 404-11.
- Duramad O, Fearon KL, Chang B, Chan JH, Gregorio J, Coffman RL, Barrat FJ. (2005) Inhibitors of TLR-9 act on multiple cell subsets in mouse and man in vitro and prevent death in vivo from systemic inflammation. *J Immunol*. 174: 5193-200.
- Dvorak HF. (1986) Tumors: Wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N. Engl. J. Med*. 315: 1650–1659.
- El-Serag HB, Rudolph KL. (2007) Hepatocellular carcinoma: Epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology*. 132: 2557–2576.
- El Kasmí KC, Smith AM, Williams L, Neale G, Panopoulos AD, et al. (2007) Cutting edge: A transcriptional repressor and corepressor induced by the STAT3-regulated anti-inflammatory signaling pathway. *J. Immunol*. 179: 7215–19.
- Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pagès C, Tosolini M, Camus M, Berger A, Wind P, Zinzindohoué F, Bruneval P, Cugnenc PH, Trajanoski Z, Fridman WH, Pagès F. (2006) Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science*. 313: 1960-4.
- Gatti G, Nuñez NG, Nocera DA, Dejager L, Libert C, Giraudo C, Maccioni M. Direct effect of dsRNA mimetics on cancer cells induces endogenous IFN β production capable of improving human dendritic cells function. *Eur. J. Immunol*. 2013. En prensa.
- Grivennikov S, Greten FR, Karin M. (2010) Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*. 140: 883-99.
- Hanahan D, Weinberg RA. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell*. 100: 57-70.
- Hanahan D, Weinberg RA. (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 144: 646-74.
- Hecht SS. (2002) Cigarette smoking and lung cancer: Chemical mechanisms and approaches to prevention. *Lancet Oncol*. 3: 461–469.
- Kamp DW, Shacter E, Weitzman SA. (2011) Chronic inflammation and cancer: the role of the mitochondria. *Oncology*. 25: 400–10, 13. 2011.
- Karin M. (2006) Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. *Nature*. 441: 431–436.
- KC S, Cárcamo JM, Golde DW. (2006) Antioxidants prevent oxidative DNA damage and cellular transformation elicited by the over-expression of c-MYC. *Mutat. Res*. 593: 64–79.
- Kim S, Takahashi H, Lin WW, Descargues P, Grivennikov S, Kim Y, Luo JL, Karin M. (2009) Carcinoma-produced factors activate myeloid cells through TLR2 to stimulate metastasis. *Nature*. 457: 102–106.
- Koebel CM, Vermi W, Swann JB, Zerafa N, Rodig SJ, Old LJ, Smyth MJ, Schreiber RD. (2007) Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature*. 450: 903-7.
- Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. (2008) Cancer-related inflammation. *Nature*. 454: 436–444.
- Martin A, Cheever and Celestia S Higanó. (2011) PROVENGE (Sipuleucel-T) in Prostate Cancer: The First FDA-Approved Therapeutic Cancer Vaccine. *Clin Cancer Res*. 17:3520–6.
- Mellman I, Coukos G, Dranoff G. (2011) Cancer immunotherapy comes of age. *Nature*. 480:480-9.
- Naik E, Dixit VM. (2011) Mitochondrial reactive oxygen species drive proinflammatory cytokine production. *J. Exp. Med*. 208: 417–20.
- Núñez NG, Andreani V, Crespo MI, Nocera DA, Breser ML, Morón G, Dejager L, Libert C, Rivero V, Maccioni M. (2012) IFN β produced by TLR4-activated tumor cells is involved in improving the antitumoral immune response. *Cancer Res*. 72:592-603.
- Palucka K, Banchereau J. (2012) Cancer immunotherapy via dendritic cells. *Nat Rev Cancer*. 12: 265-77.
- Pardoll DM. (2012) Immunology beats cancer: a blueprint for successful translation. *Nat Immunol*. 12: 1129-32.
- Pollard JW. (2004) Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat Rev Cancer*. 4:71-8.
- Rabinovich GA, Gabrilovich D, Sotomayor EM. (2007) Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. *Annu Rev Immunol*. 25:267-96.

- Ralph SJ, Rodríguez-Enríquez S, Neuzil J, Saavedra E, Moreno-Sánchez R. (2010) The causes of cancer revisited: "mitochondrial malignancy" and ROS-induced oncogenic transformation—why mitochondria are targets for cancer therapy. *Mol. Aspects Med.* 31: 145–70.
- Reedy J. (1975) Galen on cancer and related diseases. *Clio Med.* 10: 227-38.
- Restifo NP, Dudley ME, Rosenberg SA. (2012) Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response. *Nat Rev Immunol.* 12: 269-81.
- Schetter AJ, Heegaard NH, Harris CC. (2010) Inflammation and cancer: interweaving microRNA, free radical, cytokine and p53 pathways. *Carcinogenesis.* 31:37–49.
- Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. (2011) Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science.* 331: 1565-70.
- Scott AM, Wolchok JD, Old LJ. (2012) Antibody therapy of cancer. *Nat Rev Cancer.* 12: 278-87.
- Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW. (1997) Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell.* 88: 593-602.
- Trinchieri G. (2012) Cancer and inflammation: an old intuition with rapidly evolving new concepts. *Annu. Rev. Immunol.* 30:677–706.
- Uemura N, Okamoto S, Yamamoto S, Matsumura N, Yamaguchi S, Yamakido M, Taniyama K, Sasaki N, Schlemper RJ. (2001) Helicobacter pylori infection and the development of gastric cancer. *N. Engl. J. Med.* 345: 784–789.
- Vesely MD, Kershaw MH, Schreiber RD, Smyth MJ. (2011) Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annu Rev Immunol.* 29: 235-71.
- Vivier E, Ugolini S, Blaise D, Chabannon C, Brossay L. (2012) Targeting natural killer cells and natural killer T cells in cancer. *Nat Rev Immunol.* 12: 239-52.
- Wellen KE, Thompson CB. (2010) Cellular metabolic stress: considering how cells respond to nutrient excess. *Mol. Cell.* 40: 323–32.
- Weinberg F, Hamanaka R, Wheaton WW, Weinberg S, Joseph J, et al. (2010) Mitochondrial metabolism and ROS generation are essential for Kras-mediated tumorigenicity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107: 8788–93.
- Xu MY, Liu JL, Zhang RL, Fu YC. (2007) Isolation of a novel ras gene from *Trichomonas vaginalis*: a possible evolutionary ancestor of the Ras and Rap genes of higher eukaryotes. *Biochem Cell Biol.* 85: 239-45.
- Yoon JC, Ng A, Kim BH, Bianco A, Xavier RJ, Elledge SJ. (2010) Wnt signaling regulates mitochondrial physiology and insulin sensitivity. *Genes Dev.* 24:1507–18.
- Yu H, Kortylewski M, Pardoll D. (2007) Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumour microenvironment. *Nat. Rev. Immunol.* 7: 41–51.
- Zhang Z, Trautmann K, Schluesener HJ. (2005) Microglia activation in rat spinal cord by systemic injection of TLR3 and TLR7/8 agonists. *J Neuroimmunol.* 164: 154-60.
- Zitvogel, L., Apetoh, L., Ghiringhelli, F., and Kroemer, G. (2008) Immunological aspects of cancer chemotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* 8: 59–73.
- Zong, W.X., and Thompson, C.B. (2006) Necrotic death as a cell fate. *Genes Dev.* 20: 1–15.



Dr. Bernardo A. Houssay

Instituto de Biología y Medicina Experimental

IBYME

El Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME), asociado al CONICET, fue fundado por el Dr. Bernardo A. Houssay en 1944. Su misión es impulsar el conocimiento en diversas áreas como: oncología, endocrinología, reproducción, neurociencias, comportamiento, inmunopatología y biotecnología. Todo ello está orientado a ampliar el conocimiento de los principios fundamentales que rigen el funcionamiento de los seres vivos y desarrollar aplicaciones tecnológicas en el área de la biomedicina.

La Asociación Argentina para el Progreso de las Ciencias tiene el agrado de anunciar que están abiertas las postulaciones para el Premio Interciencia, según el llamado que se reproduce a continuación.

Como miembro de la Asociación Interciencia, la AAPC puede postular hasta tres candidatos al Premio. Para que AAPC pueda realizar una o más postulaciones en tiempo y forma, se deben recibir las propuestas antes del 31 de julio. Las propuestas deben incluir:

- Nota justificando la postulación;
- Curriculum Vitae del postulado;
- Nombre de hasta tres personas que puedan dar referencia del postulado.

Las propuestas se reciben en Secretaría AAPC, Avenida Alvear 1722 4º Piso, 1711 C.A. Buenos Aires. Se puede adelantar copia de la propuesta por correo electrónico a secretaria@aargentinapciencias.org.

Las decisiones de AAPC respecto a las postulaciones se tomarán en base al dictamen de un Jurado ad-hoc, constituido por especialistas. Dicha decisión será irrevocable y se comunicará el 16 de agosto.

PREMIO / AWARD / PRÊMIO INTERCIENCIA - 2013

El Gobierno de Canadá, en colaboración con la Asociación francófona pour le Savoir, en su calidad de miembro de la Asociación Interciencia, establecieron una Fundación Interciencia con la finalidad de auspiciar el otorgamiento de un Premio Anual para reconocer a un individuo que haya hecho una contribución sobresaliente para el avance en los países de las Américas de una disciplina de las ciencias y la ingeniería.

Para el PREMIO INTERCIENCIA 2013, el Comité Ejecutivo de la Asociación Interciencia, ha seleccionado el campo de BIODIVERSIDAD Y ECOLOGÍA. El jurado designado evaluará la calidad científica del trabajo de los candidatos, su repercusión en el campo respectivo y su impacto en la región. El PREMIO será otorgado en la Reunión Anual de la Asociación y consistirá de USD 5.000, una Placa Conmemorativa y una suma razonable para cubrir los gastos de viaje para asistir a la reunión.

ELEGIBILIDAD

EL PREMIO está abierto a los científicos e ingenieros nacionales o residentes legales en los países de las Américas. Cualquier individuo en la comunidad científica e ingeniería que haya hecho contribución sustancial en ciencias de la vida es elegible para este premio.

PROCEDIMIENTO DE POSTULACIÓN

Todas las Asociaciones miembros de la Asociación Interciencia podrán proponer hasta tres candidatos, incluyendo los siguientes datos:

- Nombre del postulante, dirección y teléfono.
- Nombre y el título del candidato, su afiliación institucional y dirección.
- Un resumen de acciones que forma la base de postulación (máximo 250 palabras).
- Un escrito más largo, que no exceda a tres páginas, que provea detalles adicionales para la nominación.
- Dos cartas de apoyo.
- Un Curriculum vitae (máximo 3 páginas) con las posiciones profesionales desempeñadas.
- Cualquier otra documentación (artículos y otros materiales ligeros) que ilustre el significado de los logros del candidato postulado.
- Todo el material será propiedad de la Asociación Interciencia.
- La postulación y el material (en caso de libros y otro material impreso, enviar solo la referencia o un resumen)

The Government of Canada, in collaboration with the Association francophone pour le Savoir, as a member of the Interciencia Association, have established an Interciencia Foundation with the aim of patronizing an Annual Award to recognize an individual that has made an outstanding contribution to the advancement, in the Americas, of a field of science and engineering.

For the INTERCIENCIA AWARD 2013, the Executive Council of the Interciencia Association has chosen the field of BIODIVERSITY AND ECOLOGY. The designated jury will evaluate the scientific quality of the candidates' work, and its impact on the fields and in the region. The AWARD will be bestowed at the Annual Meeting of the Association and will consist of US\$ 5,000, a Commemorative Plate and sufficient funds to attend the meeting.

ELEGIBILITY

Eligibility The AWARD is open to scientists and engineers who are nationals or legal residents of countries of the Americas. Any individual in the scientific and engineering communities that has made a substantial contribution in life sciences is eligible for this award.

NOMINATION PROCEDURE

All Member Associations of the Interciencia Association may nominate up to three candidates, including the following data:

- Nominator's name, address and telephone number.
- Candidate's name and title, institutional affiliation and address.
- A summary of facts that constitute the basis for the nomination (up to 250 words).
- A longer statement, not to exceed 3 pages, providing additional details.
- Two letters of support.
- A Curriculum vitae (maximum 3 pages) with professional position held.
- Any other documents (articles or other light materials) that illustrate the significance of the nominee's achievements.
- All the material will be the property of the Interciencia Association.
- Nomination and materials (in case of books and other printed material only references and summaries)

O Governo do Canadá, em colaboração com a Associação francófona pour le Savoir, na sua qualidade de membro da Associação Interciência, criou uma Fundação Interciência com a finalidade de auspiciar o outorgamento de um Prêmio Anual para reconhecer a um indivíduo que tenha feito uma contribuição sobresaliente para o avanço nos países das Américas de uma disciplina das ciências e a engenharia.

Para o PRÊMIO INTERCIENCIA 2013, o Comité Executivo da Associação Interciência, tem selecionado o campo da BIODIVERSIDADE/ECOLOGIA. O júri designado avaliará a qualidade científica do trabalho dos candidatos, sua repercussão no campo respectivo e seu impacto na região. O PRÊMIO será outorgado na Reunião Anual da Associação e consistirá de USD 5.000, uma Placa Comemorativa e uma soma razoável para cobrir os gastos de viagem para assistir à reunião.

ELEGIBILIDADE

O PRÊMIO está aberto aos cientistas e engenheiros nacionais ou residentes legais nos países das Américas. Qualquer indivíduo na comunidade científica e engenharia que tenha feito contribuição sustancial nas ciências da vida é elegível para este prêmio.

PROCEDIMENTO DE POSTULAÇÃO

Todas las Asociaciones miembros de la Asociación Interciencia poderão propor até três candidatos, incluindo os seguintes dados:

- Nome do postulante, endereço e telefone.
- Nome e o título do candidato, sua afiliação institucional e endereço.
- Um resumo de ações que forme a base da postulação (máximo 250 palavras).
- Um escrito mais longo, que não exceda três páginas, que provea detalhes adicionais para a nominación.
- Duas cartas de apoio.
- Um Curriculum vitae (máximo 3 páginas) com as posições profissionais desempenhadas.
- Qualquer outra documentação (artigos ou outros materiais ligeiros) que ilustre o significado das conquistas do candidato postulado.
- Todo o material será de propriedade de Associação Interciência.
- A postulação e o material (em caso de livros e outro material impreso, enviar solo a referencia ou um resu- men)

ENFERMEDADES NEUROINFLAMATORIAS DESMIELINIZANTES Y NUEVAS ALTERNATIVAS TERAPÉUTICAS

Palabras clave: Esclerosis múltiple, galectinas, glicómica.
Key words: Multiple Sclerosis, Galectins, Glicomics.

Las enfermedades desmielinizantes constituyen una importante proporción de las afecciones neurológicas que actualmente afectan a los adultos jóvenes y provocan importantes secuelas; siendo la esclerosis múltiple (EM) una de las principales. Si bien se propusieron diferentes hipótesis para explicar su etiopatogenia, la luz arrojada a partir de los hallazgos realizados durante los últimos años indica una etiología autoinmunitaria como la más probable junto a factores ambientales y genéticos que la predisponen. El desarrollo de la encefalomielitis autoinmune experimental (EAE) como modelo animal de EM ha permitido avanzar enormemente en el entendimiento de los mecanismos que operan durante la enfermedad. En su inicio, diferentes poblaciones de células T patogénicas y proinflamatorias (Th1 y Th17) desempeñan un papel central en el daño ejercido a la vaina de mielina que reviste los axones de las neuronas contribuyendo también significativamente al daño axonal observado en la enfermedad. En los últimos años, las propiedades antiinflamatorias de galectina-1 han sido ampliamente demostradas en diferentes modelos de inflamación crónica y autoinmunidad, especialmente aquellos mediados por células Th1 y Th17. En nuestro laboratorio hemos estudiado ampliamente el rol de Galectina-1 en la neuroinflamación autoinmune. Así, hallamos que la administración terapéutica de Galectina-1 permitiría atenuar la severidad de esta enfermedad a través de la eliminación selectiva de células Th1 y Th17 patogénicas y la activación de circuitos inmuno-regulatorios tanto a nivel periférico, mediante la inducción de células dendríticas (CDs) tolerogénicas, como a nivel del sistema nervioso central a través de la desactivación de la microglia (células de linaje monocítico presentes en el sistema nervioso) por parte de los astrocitos (células de linaje neuroectodérmico que juegan un rol clave para la realización de la actividad nerviosa).

■ Santiago P. Méndez Huergo*,
Marta Toscano,
Sebastián Maller,
Gabriel Rabinovich

Instituto de Biología y Medicina Experimental,
CONICET.

*santiago.mendezhuergo@gmail.com

Demyelinating diseases are among the most relevant neurological disorders affecting young people nowadays, being multiple sclerosis (MS) the most frequent. Although several theories regarding the genesis of this disease have been proposed, recent advances strongly support an autoimmune origin combined with environmental and genetic factors. The development of an animal model of MS, the experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), has brought light to many of the mechanisms underlying this pathology. Pro-inflammatory, pathogenic T cells, such as Th1 and Th17 cells, play a key role in tissue damaging and, therefore, demyelination of the Central Nervous System (CNS) in MS. During the last years, Galectin-1 has emerged as an endogenous protein with proved anti-inflammatory proprieties in different experimental models of chronic inflammation and autoimmunity, especially in those pathologies mediated by Th1 and Th17 cells. In our laboratory, we have largely studied the role of this lectin in autoimmune neuroinflammation. We have found that administration of recombinant Galectin-1 suppressed inflammation-mediated neurodegeneration through mechanisms involving specific deletion of Th1- and Th17-pathogenic cells and activation of regulatory circuits both at the periphery, by endowing dendritic cells with tolerogenic potential and, in the CNS, by astrocyte-mediated microglial deactivation. Thus, Galectin-1-glycan interactions are essential in tempering neurodegeneration with critical therapeutic implications for MS.

Demyelinating diseases are among the most relevant neurological disorders affecting young people nowadays, being multiple sclerosis (MS) the most frequent. Although several theories regarding the genesis of this disease have been proposed, recent advances strongly support an autoimmune origin combined with environmental and genetic factors. The development of an animal model of MS, the experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), has brought light to many of the mechanisms underlying this pathology. Pro-inflammatory, pathogenic T cells, such as Th1 and Th17 cells, play a key role in tissue damaging and, therefore, demyelination of the Central Nervous System (CNS) in MS. During the last years, Galectin-1 has emerged as an endogenous protein with proved anti-inflammatory proprieties in different experimental models of chronic inflammation and autoimmunity, especially in those pathologies mediated by Th1 and Th17 cells. In our laboratory, we have largely studied the role of this lectin in autoimmune neuroinflammation. We have found that administration of recombinant Galectin-1 suppressed inflammation-mediated neurodegeneration through mechanisms involving specific deletion of Th1- and Th17-pathogenic cells and activation of regulatory circuits both at the periphery, by endowing dendritic cells with tolerogenic potential and, in the CNS, by astrocyte-mediated microglial deactivation. Thus, Galectin-1-glycan interactions are essential in tempering neurodegeneration with critical therapeutic implications for MS.

■ ESCLEROSIS MÚLTIPLE. UNA ENFERMEDAD AUTOINMUNE DESMIELINIZANTE

La Esclerosis Múltiple (EM) es una enfermedad crónica del Sistema

Nervioso Central (SNC), de origen autoinmune, caracterizada por signos de inflamación, desmielinización y pérdida axonal irreversible (Sospedra & Martin, 2005). El proceso inflamatorio induce desmieli-

nización fundamentalmente en el SNC comprometiendo el encéfalo, los nervios ópticos y la medula espinal alterando así la conducción del impulso nervioso. Los síntomas varían considerablemente según

qué áreas se vean afectadas y entre los más relevantes se hallan el déficit motor y/o sensitivo, los trastornos oculomotores, la pérdida de la agudeza visual, los trastornos en la coordinación y la afectación esfinteriana. Estudios neuropsicológicos demostraron que un 35-65% de los pacientes también desarrollan déficit cognitivo y suelen presentar signos de depresión, labilidad emocional, euforia y enfermedad bipolar (Sospedra & Martin, 2005). Esta enfermedad afecta preponderantemente a adultos jóvenes en plena etapa productiva y a medida que transcurre el tiempo conduce a un estado de discapacidad neurológica generando serio impacto y repercusión en el ámbito familiar, social y económico-laboral.

Se estima que aproximadamente 2,1 millones de personas en el mundo poseen esta enfermedad, representando la segunda causa de discapacidad neurológica en adultos jóvenes a nivel mundial. No obstante, este valor se encuentra subestimado debido a que, en algunos casos, las manifestaciones de la EM pueden ser invisibles para el paciente (www.nationalmssociety.org). En nuestro país, la prevalencia de EM se ha estimado en 18 personas cada 100.000 habitantes, con mayor frecuencia en el sexo femenino entre los 20-40 años de edad (Crisitano, 2008; Melcon, 2008; Cristiano, 2009).

■ PATOGÉNESIS DE LA EM

Aunque la etiología de la EM es multifactorial, numerosas evidencias indican que el desarrollo de una respuesta inflamatoria autoinmune dirigida contra componentes de la mielina juega un papel crítico en la patogénesis y evolución de esta enfermedad (Sospedra & Martin, 2005; McFarland & Martin, 2007). La hipótesis más aceptada es que la EM resulta de la combinación de

factores ambientales y genéticos que la predisponen. Numerosos estudios genético-epidemiológicos proveen evidencias convincentes de que la susceptibilidad a la enfermedad es hereditaria (pero no la enfermedad en sí) al demostrarse que mientras el riesgo normal de desarrollar EM es de 1/750, éste aumenta a 1/40 en aquellas personas que presentan un familiar cercano (padre, hermano, hijo) con EM (Dymet, 2004). Entre los factores ambientales, se ha postulado que ciertas infecciones virales (como por ejemplo, la mononucleosis por *Epstein-Barr*), el déficit de Vitamina D y el tabaquismo estarían involucradas en facilitar el desarrollo de EM (Lunemann, 2007).

La EM es una enfermedad sumamente heterogénea, lo cual se refleja en su fenotipo clínico variable, la diversidad de lesiones neuropatológicas y su divergente patogénesis molecular. La histopatología de esta enfermedad exhibe un cuadro complejo caracterizado por inflamación, desmielinización y re-mielinización dinámica, y daño axonal/neuronal tanto en lesiones subcorticales como en lesiones corticales diseminadas. En principio, todos los componentes celulares y humorales de la respuesta inmune innata y adaptativa pueden ser identificados en las lesiones de EM (Siffrin, 2007).

Estudios inmunohistoquímicos del infiltrado inflamatorio de lesiones de pacientes con EM y resultados obtenidos en el modelo experimental en ratones, *encefalomielitis autoinmune experimental* (EAE), han revelado el protagonismo de células T autoreactivas en la patogénesis de la enfermedad (Siffrin, 2007). Tanto las observaciones en pacientes como los datos obtenidos en distintos modelos experimentales, indican que la activación de células T CD4⁺ autorreactivas y su posterior diferenciación a células T efectoras,

son eventos cruciales en las etapas iniciales de la EM, y probablemente también durante el curso y evolución de esta patología (Prineas & Raine, 1976; Adams, 1989; Sospedra & Martin, 2005; McFarland & Martin, 2007). Sin embargo, la lesión del tejido blanco es también mediada por otros componentes del sistema inmune tales como anticuerpos, complemento y citoquinas producidas por células del sistema inmune innato. Además, existen evidencias claras de que alteraciones del balance entre células T efectoras y regulatorias podrían ser responsables de la naturaleza intermitente o progresiva crónica de la enfermedad (Olsson, 1992).

Como consecuencia de la respuesta inflamatoria, se generan múltiples placas de desmielinización que se presentan en distintos estadios evolutivos junto a un grado variable de compromiso axonal, el cual es observado tempranamente y se lo ha asociado a la irreversibilidad de ciertos síntomas que presentan estos pacientes (Olsson, 1992; Trapp, 1998). Las placas suelen medir entre 2 mm y 6 cm y se localizan frecuentemente en la sustancia blanca subependimaria o periventricular (ventrículos laterales y cuarto ventrículo), en el límite entre la sustancia gris cortical y la sustancia blanca subcortical, en los nervios, quiasma y cintillas ópticas, en el tronco cerebral, pedúnculos y laminillas cerebelosas como así también en la médula espinal, existiendo una clara asociación entre las lesiones y la presencia de infiltrados inflamatorios perivasculares (Trapp, 1998, Rudick & Trapp, 2009). Es importante destacar que si bien estas placas en la sustancia blanca del cerebro y médula espinal son los signos morfológicos más obvios de la enfermedad, neuronas y axones son también un blanco importante de la respuesta inflamatoria en el SNC (Trapp,

1998; Rudick & Trapp, 2009).

En los últimos años una gran cantidad de estudios han demostrado que, asociados al componente inflamatorio, factores inherentes al SNC juegan un papel importante en el desarrollo de la EM. En este sentido se ha observado que la vulnerabilidad del SNC al impacto de la reacción inflamatoria y la capacidad de reparación tisular se encuentran alteradas de manera heterogénea en distintos pacientes (Weiner, 2009). Por lo tanto, la comprensión de la etiología y patogénesis de EM requiere la consideración de componentes inherentes al sistema inmune y propios del sistema nervioso, como así también de la interacción dinámica entre los mismos.

■ DIAGNÓSTICO Y CURSO CLÍNICO

Las dificultades en el diagnóstico de la EM se reflejan en que aún hoy, a pesar de los adelantos en los métodos complementarios de diagnóstico, se demora entre 4 y 5 años para poder establecerlo. Considerando que el pronóstico de la enfermedad en términos de discapacidad

se determina justamente en los primeros años de su evolución, urge la necesidad de lograr acortar estos tiempos con el objeto de insaturar tempranamente terapias tendientes a demorar el proceso neurodegenerativo. Ante la ausencia aún de una prueba específica, el diagnóstico continúa basándose en “criterios” que brindan pautas o guías para avanzar en el problema pero no lo resuelven de manera definitiva. Los criterios de Schumacher (1965) fueron los primeros en establecer la necesidad de dos conceptos esenciales para el diagnóstico: a) demostración de dos o más lesiones del SNC diseminadas en tiempo y espacio; y b) exclusión de otras patologías que pudieran manifestarse de manera similar. Con el correr de los años, los avances generados tanto en el conocimiento de la EM, como también en las herramientas de diagnóstico, dieron lugar a la generación de criterios más modernos como los de Poser en 1983, los de McDonald en el 2001 y finalmente los Revisados de McDonald en el 2005. Todos estos criterios dan valor a los métodos complementarios como la resonancia magnética, el análisis del líquido céfalo-raquídeo y los potenciales

evocados visuales, a fin de facilitar el diagnóstico de la enfermedad. No obstante, todos ellos siguen manteniendo el concepto original de eventos separados en el tiempo y espacio para sostener el diagnóstico (Correale, 2011).

Desde el punto de vista clínico, la EM es una enfermedad de evolución variable. El 85% de los pacientes inician su enfermedad con un curso que involucra brotes y remisiones, caracterizado por episodios agudos de déficit neurológico (brotes), seguidos de episodios de estabilidad (remisión). Comienza con un cuadro agudo o subagudo focal, que evoluciona en el término de 24 a 72 hs, se estabiliza y mejora de modo espontáneo. Esta forma clínica de la EM se denomina *remitante recurrente* (Tabla I). Estudios de la historia natural de la enfermedad han demostrado que el 50% de estos pacientes, luego de 10-15 años, evoluciona hacia una forma clínica caracterizada por deterioro neurológico progresivo e irreversible, la cual se denomina *secundaria progresiva* (Sospedra & Martin, 2005). Un brote se define como la ocurrencia de síntomas de disfunción neurológica de más de

Tabla I. Criterio de clasificación adoptado por el Comité Internacional de Estudio de la EM

Clasificación	Características
<i>Remitante Recurrente (RR)</i>	Presencia de brotes de la enfermedad claramente definidos con recuperación completa o secuelas. No existe progresión de la enfermedad entre los brotes. El 85% de los pacientes presentan esta forma clínica.
<i>Secundaria Progresiva (SP)</i>	El curso inicial es RR, seguido de incremento de la discapacidad en forma progresiva, con o sin brotes concomitantes
<i>Primaria Progresiva (PP)</i>	Progresión de la enfermedad desde el inicio, con estabilizaciones ocasionales y mejorías menores temporales. No presentan brotes de la enfermedad.
<i>Progresiva Recurrente (PR)</i>	Enfermedad progresiva desde el inicio con brotes evidentes, con o sin recuperación completa y con períodos entre brotes caracterizados por progresión continua.

24 h de duración y en las cuales se han excluido otras causas como fiebre o trastornos metabólicos. La ocurrencia de dos brotes independientes se considera cuando éstos están separados por un periodo de al menos un mes y afectan diferentes áreas del SNC. Las manifestaciones clínicas más comunes incluyen neuritis óptica, debilidad muscular, trastornos sensoriales, alteraciones esfinterianas, ataxia cerebelosa, disfunción del tronco cerebral, temblor y fatiga (Rabinovich, 2004; Correale, 2011).

Existen diversos factores clínicos y demográficos predictivos del curso de la EM. De este modo *a)* el género masculino, *b)* la edad de inicio tardía, *c)* la elevada frecuencia de brotes en los primeros años de la enfermedad y *d)* el intervalo de tiempo corto en alcanzar discapacidad moderada son marcadores de mala evolución de la enfermedad. Tal como mencionamos anteriormente, una pequeña proporción de pacientes no experimentan brotes sino que presentan una aparición y progresión gradual de déficit neurológicos desde el inicio de la enfermedad. Esta forma clínica conocida como *primaria progresiva* afecta predominantemente a hombres, luego de los 45-50 años y representa la forma de inicio en el 15% de los casos (Lublin & Reingold, 1996). En la Tabla I se resumen los criterios de clasificación de las distintas formas clínicas de la EM adoptado por el Comité Internacional de Estudio de la EM en 1996.

■ ENCEFALOMIELITIS AUTOINMUNE EXPERIMENTAL: MODELO ANIMAL PARA EL ESTUDIO DE LA EM

La comprensión de los mecanismos inmunológicos y neurológicos implicados en cada forma particular de la enfermedad permite el diseño

de terapias adecuadas y personalizadas. En este sentido, el análisis exhaustivo en modelos experimentales como el de la *Encefalomiелitis Autoimmune Experimental* (EAE), descrito por Thomas M. Rivers en 1933, ha permitido el descubrimiento de algunos de los mecanismos fisiopatológicos de la enfermedad autoinmune desmielinizante así como también el estudio comparativo de diferentes estrategias terapéuticas (Zamvil & Steinman, 1990; Kuchroo, 2002; Baxter, 2007). Este modelo experimental, desarrollado en diferentes especies animales (cerdos, conejos, ratas, ratones, cabras, etc.) se caracteriza clínicamente por la presentación de parálisis muscular ascendente debida a un proceso inflamatorio del SNC inducido por la inoculación de extractos proteicos cerebrales o antígenos peptídicos específicos (Baxter, 2007). Si bien en los comienzos estos modelos no reflejaban en su totalidad las etapas de la enfermedad desmielinizante humana, lograron aportar información crítica en el campo de la neuroinmunología. El conocimiento y experiencia adquirida permitió adaptar y refinar estos modelos de modo tal que en la actualidad la EAE logra recapitular diversos aspectos fisiopatológicos de la EM (Stromnes & Goverman, 2006; Stromnes & Goverman, 2006; Baxter, 2007).

En general, la inducción de EAE requiere de la inmunización subcutánea con proteínas de mielina o péptidos emulsificados en adyuvantes de naturaleza pro-inflamatoria. Esta estrategia constituye la llamada inducción de EAE activa. Mientras la activación de células T en la EAE activa parece ser similar en todos los modelos en roedores, la fase efectora en los órganos blanco, así como también el proceso de cronificación de la enfermedad, parecen depender de la cepa y otras características específicas de cada especie (Siffrin,

2007). Varios modelos de EAE en ratones que utilizan proteína básica de mielina (PBM) durante la inmunización exhiben una enfermedad monofásica (un único brote) pero con un curso altamente desmielinizante, reflejando la encefalomiелitis diseminada aguda en el humano (Nogai, 2005). Sin embargo, la EAE inducida en la cepa SJL/J de ratón es uno de los modelos que más se aproxima a la EM humana, ya que estos ratones, al ser inmunizados con Proteína Proteolípídica (PLP), desarrollan una enfermedad con exacerbaciones y remisiones. Al igual que en la EM humana, los hallazgos histopatológicos incluyen inflamación con infiltrado de macrófagos y linfocitos T y extensa desmielinización y daño neuronal y axonal en etapas tempranas de la enfermedad (Diesel, 2003; Aktas, 2005). Otros aspectos de la neuroinflamación crónica pueden ser investigados en ratones de la cepa C57BL/6 en los cuales la inmunización con glicoproteína oligodendrocitaria de mielina (MOG) en Adyuvante de Freund Completo (AFC) y posterior inyección de la toxina de *B. pertussis*, logra inducir un episodio agudo severo de EAE seguido de recuperación incompleta y un estado de deterioro silencioso progresivo secundario similar al presente en las etapas tardías de la EM (Mendel, 1995). Mientras que ratones de la cepa C57BL/6 son relativamente sensibles a la inducción de EAE y alcanzan importantes grados de severidad de la enfermedad, aquéllos pertenecientes a la cepa 129/Sv son relativamente resistentes a la inducción de la EAE. Esta particular diferencia permite la utilización de estas dos cepas de ratones a los fines de evaluar variables que disminuyen o incrementan la severidad de la patología, de acuerdo a la hipótesis de trabajo a estudiar.

■ CÉLULAS EFECTORAS EN LA RESPUESTA AUTOINMUNE DESMIELINIZANTE: PAPEL CRÍTICO DE LAS CÉLULAS TH1 Y TH17

El paradigma clásico planteado por Mossmann en el año 1986 postula que durante una respuesta inmune los linfocitos T CD4⁺ se diferencian hacia un fenotipo Th1 productor de IFN- γ o hacia un perfil Th2 productor de IL-4 e IL-5 (Mossmann, 1986). Sin embargo, actualmente se conoce una variedad de linajes Th nuevos, alternativos a las subpoblaciones clásicas Th1 y Th2 (Mossmann, 1986; Glimcher & Murphy, 2000; Reiner, 2009). De este modo, las células Th17 (Harrington, 2005; Bettelli, 2007), Th foliculares (Thf) (King, 2008) y las recientemente descritas Th9 (Veldhoen, 2008) y Th22 (Trifari, 2009) han enriquecido el abanico de células T *helper* o colaboradoras.

Durante más de dos décadas el paradigma Th1/Th2 constituyó el marco teórico para explicar procesos inmunológicos patológicos de etiología infecciosa, alérgica o autoinmune (Coffman, 2006). Fue así que, estudios iniciales observaron que células T CD4⁺ con un perfil Th1 eran las responsables de la severidad del proceso autoinmune en la EM y la EAE, mientras que la recuperación de la enfermedad estaba asociada a la presencia de células con un perfil de tipo Th2 (Steinman, 2007). Sin embargo, estudios posteriores demostraron que en el modelo de EAE, al igual que en otros modelos de autoinmunidad órgano específica, las grandes responsables del desarrollo y persistencia del proceso inflamatorio son las células Th17 (Bettelli, 2007; Stromnes, 2008). Esta subpoblación de células T efectoras depende de manera crítica de la presencia de IL-6 y TGF- β para su diferenciación y de IL-23 y del factor de transcripción ROR γ t para su desarrollo y expansión (Gijbels, 1995; Cua, 2003; Veldhoen,

2006). De modo similar a la EAE, se ha observado que esta subpoblación cumple un papel crítico en la patogénesis de la enfermedad desmielinizante humana (Stromnes, 2008), donde la expresión de IL-17 se halla incrementada en células mononucleares obtenidas de sangre periférica y líquido cefalorraquídeo de pacientes con EM en comparación con sujetos normales (Matusevicius, 1999). Asimismo, la presencia de transcritos para IL-17, IL-6 e IL-23 ha sido descrita en placas de desmielinización (Lock, 2002) y células dendríticas mieloides de pacientes con EM secretan niveles incrementados de IL-23, sugiriendo que este tipo de células cumple un papel clave en la patogénesis de la EM (Vaknin-Dembinsky, 2006).

■ GALECTINA-1: PROTEÍNA DE UNIÓN A CARBOHIDRATOS CON PROPIEDADES INMUNO-REGULATORIAS

Las galectinas constituyen una familia de proteínas endógenas caracterizadas por su capacidad de unión a azúcares con residuos β -galactósidos presentes en diferentes glicoproteínas de la membrana plasmática y la matriz extracelular. Estas proteínas reconocen en forma específica unidades repetitivas de [Galactosa β 1-4-N-Acetil-Glucosamina] (N-acetil-lactosamina, LacNAc) presentes en N- y O-glicanos, a través de un dominio altamente conservado de 135 aminoácidos denominado DRC (Dominio de Reconocimiento de Carbohidratos) (Rabinovich & Toscano, 2009). Se han identificado 15 galectinas en mamíferos, que se clasifican según la estructura que presentan en: "proto-tipo", "quimera" y "repeticiones en tandem" (Cooper, 2002).

Durante los últimos años se ha asignado a las galectinas un papel fundamental en la regulación de la respuesta inmune (Sato & Nieminen,

2004; Rabinovich, 2007). En particular, Galectina-1 ha sido implicada en la regulación de la maduración, migración, activación y supervivencia de linfocitos T tanto a nivel central (estroma tímico) como periférico (tejidos inflamados y órganos linfáticos secundarios). Se ha demostrado que esta proteína inhibe la proliferación y expansión clonal de linfocitos T activados, mediante mecanismos que involucran bloqueo de la activación celular (Chung, 2000), arresto del ciclo celular (Rabinovich, 1997; Blaser, 1998) e inducción de apoptosis (Perillo, 1995; Rabinovich, 1998; Rabinovich, 2002). A su vez, Galectina-1, en concentraciones inferiores a 3 μ M, posee propiedades inmunosupresoras independientes de su efecto pro-apoptótico, ya que es capaz de inhibir la adhesión de linfocitos T activados a diferentes proteínas de la matriz extracelular, tales como laminina y fibronectina, y bloquea la secreción de citoquinas pro-inflamatorias como TNF- α e IFN- γ (Rabinovich, 1999).

Las propiedades anti-inflamatorias de galectina-1 han sido ampliamente demostradas en diferentes modelos de inflamación crónica y autoinmunidad (Figura 1). Particularmente, se ha demostrado que la administración de Galectina-1, por terapia génica o proteica, disminuye la respuesta inflamatoria y las manifestaciones clínicas de la artritis inducida por colágeno (AIC), un modelo experimental de artritis reumatoidea en ratón (Rabinovich, 1999). En este modelo el tratamiento provoca un aumento en la susceptibilidad de los linfocitos T auto-reactivos a la apoptosis y un desvío de la respuesta hacia un perfil Th2, caracterizado por una disminución en la producción de IFN- γ y un aumento de la expresión de IL-5. Estos resultados han sido reproducidos en numerosos modelos de autoinmunidad órgano-específica como la

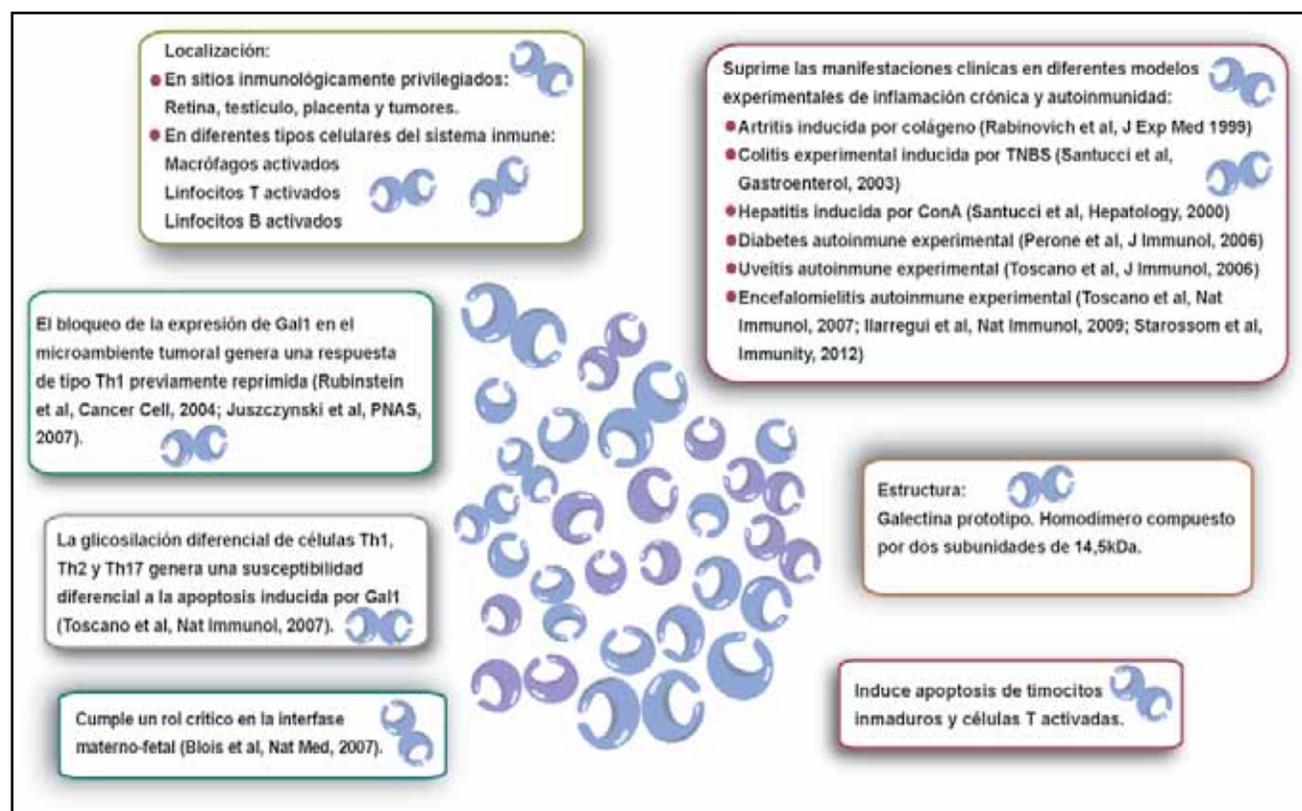


Figura 1. Propiedades inmunosupresoras de Galectina-1.

colitis inducida por ácido sulfónico trinitrobenzeno (TNBS), la hepatitis inducida por concanavalina A, la diabetes autoinmune y la uveítis autoinmune experimental, entre otros (Baum, 2003; Santucci, 2003; Perone, 2006; Toscano, 2006). Asimismo, en un modelo experimental de rechazo fetal inducido por estrés, observamos que la administración de Galectina-1 restaura la tolerancia mediante el desvío de la respuesta inmune hacia un perfil de células Th2 y T regulatorias (Blois, 2007).

■ GALECTINA-1 COMO POTENCIAL AGENTE TERAPÉUTICO EN EM

Estudios previos de nuestro laboratorio utilizando animales deficientes en el gen de Galectina-1 (*Lgals1^{-/-}*) demostraron claramente que la ausencia de esta proteína afecta el desarrollo y evolución de la enfermedad autoinmune desmielinizante (Toscano, 2007). El experi-

mento clave consistió en inducir EAE en ratones *Lgals1^{-/-}* o WT (*wild type*) hembras de la cepa 129/Sv por inmunización con el péptido 35-55 de la glicoproteína oligodendrocitaria de mielina (MOG₃₅₋₅₅) en Adyuvante de Freund Completo. Esta cepa de ratones es parcialmente resistente a la inducción de EAE, por lo cual brinda el margen necesario para observar un incremento en la severidad clínica y las manifestaciones inmunológicas concomitantes. La magnitud y severidad de la enfermedad se evaluó diariamente y, si bien luego de un seguimiento de 30 días ratones *Lgals1^{-/-}* y WT presentaban la misma incidencia y día de inicio de las manifestaciones clínicas, los ratones *Lgals1^{-/-}* exhibieron un incremento significativo en el grado de compromiso clínico. Asimismo, a nivel histopatológico, los ratones *Lgals1^{-/-}* presentaron un extenso infiltrado inflamatorio y áreas mayores de desmielinización en secciones de médula espinal. Además, células

de bazo de ratones *Lgals1^{-/-}* exhibieron una mayor respuesta proliferativa antígeno-específica, un incremento significativo en la frecuencia de células CD4⁺IL-17⁺ (Th17) y CD4⁺IFN- γ ⁺ (Th1) y, congruente con esto, produjeron niveles significativamente superiores de IL-17 e IFN- γ . Estos resultados sitúan a Galectina-1 como un factor endógeno capaz de inhibir la severidad de la respuesta inflamatoria patogénica en el modelo de EAE a través de la regulación negativa de poblaciones Th1 y Th17 efectoras. Sin embargo, el resultado más contundente, y probablemente más relevante con fines terapéuticos, lo obtuvimos al intentar validar lo que habíamos observado a través del camino inverso. Es decir, indujimos EAE en ratones C57BL/6 WT, cepa altamente susceptible, y luego tratamos estos ratones con Galectina-1 recombinante. El tratamiento mostró una significativa y marcada disminución de la severidad clínica de la enfermedad. En congruencia

con estos datos, observamos niveles disminuidos de IL-17 e IFN- γ , y un menor número de células CD4⁺IL-17⁺ (Th17) y CD4⁺IFN- γ ⁺ (Th1). Estos hallazgos mostraron claramente que Galectina-1 promueve una disminución de la severidad de la patología autoinmune desmielinizante, posicionándola como un potencial agente terapéutico muy atractivo.

Tal como describimos previamente, Galectina-1 interacciona con alta avidéz con glicoconjugados que contienen unidades múltiples de *N*-acetil-lactosamina (poli-LacNAc) presentes en *N*- y *O*-glicanos de glicoproteínas de la membrana plasmática y la matriz extracelular (Hirabayashi, 2002; Leffler, 2004). La síntesis de dichas cadenas de poli-LacNAc se halla regulada, en parte, por la enzima glicosiltransferasa GCNT1 en el caso de *O*-glicanos y la enzima GnT5 en el caso de los *N*-glicanos (Daniels, 2002). De este modo, la expresión de estas glicosiltransferasas durante el desarrollo, activación y diferenciación de las células T facilitarían la síntesis de cadenas poli-LacNAc que, a su vez, podrían determinar la unión de Galectina-1 a la superficie celular. A su vez, se ha demostrado que la adición de residuos de ácido siálico con enlaces α -2,6 (generados por la

enzima ST6Gal1) a las estructuras poli-LacNAc de *N*-glicanos es capaz de inhibir la unión de Galectina-1 a sus ligandos específicos (Amano, 2003). De este modo, la síntesis o el enmascaramiento de residuos de azúcares específicos en glicoproteínas de la superficie celular permite o impide la unión de Galectina-1 y su acción reguladora sobre las células T.

Basados en esto, estudiamos los mecanismos involucrados en la regulación negativa de las poblaciones Th1 y Th17 observadas durante la EAE, centrándonos en el perfil de glicosilación de las diversas subpoblaciones de células Th. Así, hallamos que linfocitos Th2 exponen altos niveles de ácido siálico α -2,6 en sus glicoproteínas de superficie en comparación con linfocitos Th1 y Th17. Esto se vio acompañado de una elevada capacidad de unión de Galectina-1 a la superficie de células Th1 y Th17, no así de células Th2. Por lo tanto, la susceptibilidad diferencial de las células Th1, Th17 y Th2 a la apoptosis inducida por Galectina-1 se explicaría por la glicosilación diferencial de sus glicoproteínas de superficie celular (Figura 2). Mientras que las células Th1 y Th17 poseen el repertorio de glicanos necesarios para la unión y acción de Galectina-1, los linfocitos

Th2 son resistentes a su acción ya que exhiben un patrón de glicosilación rico en ácido siálico α -2,6, el cual bloquea la unión de esta lectinas (Toscano, 2007). Estos hallazgos explicarían la capacidad que Galectina-1 posee a la hora de regular las respuestas inmune de perfiles Th1 y Th17 patogénicas durante la EAE e inhibir así la neuroinflamación autoinmune.

En paralelo a estas observaciones, Demetriou y colaboradores describieron que ratones deficientes en el gen que codifica para GnT5 (*Mgat5*^{-/-}), enzima responsable de generar *N*-glicanos complejos, presentan mayor susceptibilidad al desarrollo de EAE (Demetriou, 2001). De acuerdo a este hallazgo y en un trabajo posterior de dicho grupo, se observó que las cepas de ratones más susceptibles al desarrollo de EAE (tales como PL/J, SJL, y NOD) poseen una disminución natural en el grado de ramificaciones en *N*-glicanos (Lee, 2007). En particular, se ha descrito que la cepa PL/J presenta los niveles más reducidos de ramificación, a causa de una deficiencia parcial en las enzimas *N*-acetilglucosamiltransferasas I, II, y V (*Mgat1*, 2, and 5), y con el tiempo desarrollan espontáneamente un proceso de neuroinflamación mediada por linfocitos T que conduce

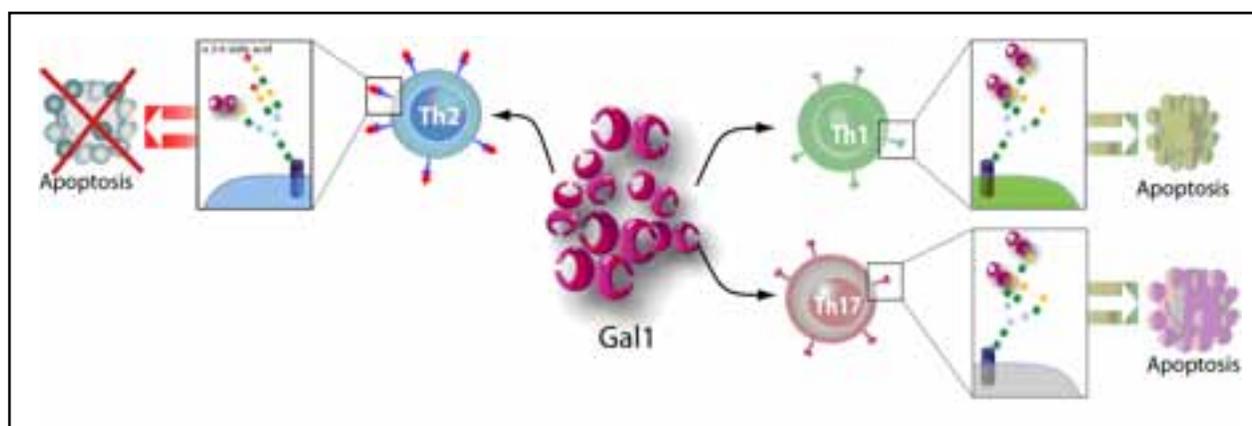


Figura 2. Glicosilación y susceptibilidad diferencial de células Th1, Th2 y Th17 a la apoptosis inducida por Galectina-1.

a la desmielinización y neurodegeneración. De este modo, se puede pensar que el procesamiento de N-glicanos en el aparato de Golgi sería una característica heredable que determinaría en estos animales la susceptibilidad a EAE. Asimismo, sugieren que deficiencias en la síntesis de las ramificaciones de residuos GlcNAc en N-glicanos promoverían la desmielinización y neurodegeneración mediada por células T, características de la EM.

■ EFECTO TERAPÉUTICO DE CDS DIFERENCIADAS EN PRESENCIA DE GALECTINA-1 SOBRE LA ENFERMEDAD AUTOINMUNE DESMIELINIZANTE

Además de la participación de mecanismos efectores mediados por células Th1 y Th17, alteraciones en mecanismos de tolerancia periférica fueron descritas recientemente en enfermedades autoinmunes y en EM en particular. Estos mecanismos involucran diferentes poblaciones de células regulatorias tales como células T regulatorias inducibles productoras de IL-10 (Tr1), células Th3 productoras de TGF- β y células T regulatorias naturales o inducibles caracterizadas por la expresión conjunta de las moléculas CD4, CD25 y del factor de transcripción FoxP3 (Tregs) (Roncarolo & Levings, 2000; Viglietta, 2004). Por otro lado, se ha observado que la presencia de un microambiente inmunosupresor favorece la expansión y diferenciación de un tipo de CDs con características regulatorias, capaces de sintetizar IL-27 e IL-10. Para estas células se ha acuñado el nombre de *células dendríticas tolerogénicas*.

Las CDs son células presentadoras de antígeno profesionales, altamente especializadas en reconocer, procesar y presentar antígenos a células T vírgenes (Guermonpez, 2002; Steinman, 2003; Reis e Sousa,

2006). En líneas generales, las CDs han despertado un gran interés en cuanto a su capacidad de promover la iniciación de una respuesta mediada por células T (Guermonpez, 2002). Sin embargo, como acabamos de mencionar, las CDs poseen también la facultad de desarrollar capacidades regulatorias y promover la tolerancia periférica, ya sea a través de la inducción de anergia de células T o favoreciendo la diferenciación de células T regulatorias, incluyendo aquellas con fenotipo CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ y células T regulatorias de tipo 1 productoras de IL-10 (Steinman, 2003; Morelli, 2005; Rutella, 2006). La ausencia de este tipo de CDs tolerogénicas podría determinar el desarrollo y amplificación del fenómeno autoinmune (Stumhofer, 2006; Awasthi, 2007; Fitzgerald, 2007). Teniendo en cuenta su exquisita plasticidad, se ha propuesto que las CDs tolerogénicas podrían ser explotadas terapéuticamente a los fines de atenuar la respuesta inmune, especialmente en el control de enfermedades autoinmunes (Rutella, 2006; Morelli & Thomson, 2007).

Con el objeto de determinar el impacto de Galectina-1 sobre la fisiología de las CDs, en nuestro laboratorio estudiamos el efecto de esta lectina sobre su funcionalidad. La exposición de CDs a Galectina-1 durante el proceso de diferenciación logró generar una población de CDs (CD_{Gal-1}) con baja expresión de CD11c (marcador de membrana característico de CDs inmunogénicas) y alta expresión de CD45RB (marcador de superficie asociado a CDs regulatorias) (Wakkach, 2004; Svensson, 2004). Dichas CDs diferenciadas en presencia de Galectina-1 producen mayores niveles de la citoquina IL-27. En el contexto de mecanismos de tolerancia periférica, IL-27 ha sido recientemente identificada como una citoquina do-

minante producida por CDs tolerogénicas que, junto a IL-6, induce la diferenciación de células T regulatorias productoras de IL-10 (Awasthi, 2007; Fitzgerald, 2007; Stumhofer, 2007).

Tanto la EM como la EAE se caracterizan por un infiltrado inflamatorio compuesto de células T, macrófagos, astrocitos y microglia con participación de CDs responsables de su activación y por la presencia de placas focales de desmielinización que ocasionan distintos grados de déficit neurológico (Steinman, 1996; Sospedra & Martin, 2005). A su vez, es importante destacar que, tanto en la EM como en la EAE, las células Th1 y Th17 son críticas en el establecimiento, severidad y persistencia de la enfermedad inflamatoria (Sospedra & Martin, 2005; Steinman, 2007). Estudios recientes han propuesto el uso potencial de CDs regulatorias como herramientas terapéuticas para suprimir la progresión de enfermedades autoinmunes (Chorny, 2005; Rutella, 2006; Morelli & Thomson, 2007). En este contexto, decidimos evaluar el efecto terapéutico de la transferencia adoptiva de CDs tolerogénicas diferenciadas en presencia de Galectina-1 (CD_{Gal1}) sobre las manifestaciones clínicas e inmunológicas de la EAE. De esta forma, hallamos que el tratamiento con CDs antígeno-específicas diferenciadas en presencia de Galectina-1 en el día del inicio de los síntomas clínicos (grado clínico = 1) logró reducir drásticamente las manifestaciones clínicas de la EAE. Se observó también una reducción en los niveles de desmielinización y una disminución del infiltrado inflamatorio en secciones de médula espinal. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas cuando ratones con EAE fueron inyectados con CDs o CD_{Gal1} que no eran antígeno específicas sugiriendo la relevancia de la especificidad antigéni-

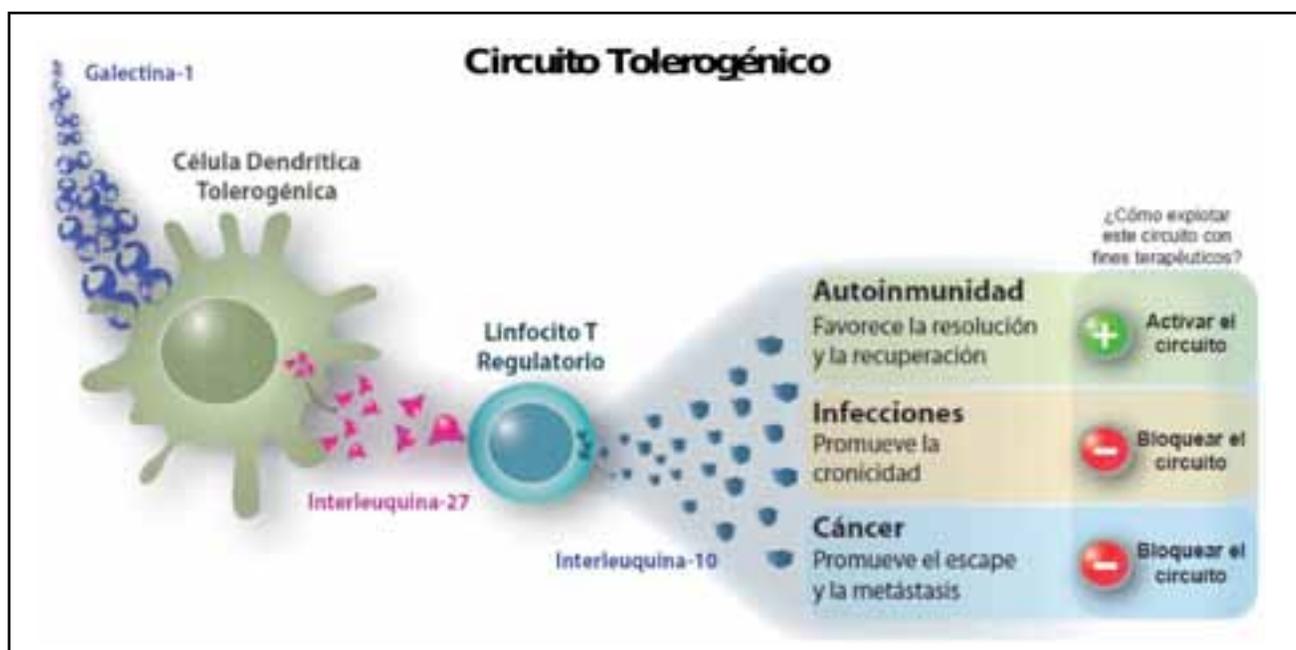


Figura 3. Galectina-1 gatilla un circuito regulatorio a través de la inducción de CDs tolerogénicas productoras de IL-27 capaces de promover la diferenciación de células Tr1 productoras de IL-10.

ca en este efecto biológico. Además, los ratones exhibieron niveles significativamente inferiores de IL-17 e IFN- γ y niveles mayores de IL-10 (Ilarregui, 2009).

Por lo tanto, podemos pensar que la administración terapéutica de CDs diferenciadas en presencia de Galectina-1 (CD_{Gal1}) es capaz de inducir una respuesta anti-inflamatoria caracterizada por producción considerable de IL-10 e inhibición de los perfiles celulares Th1 y Th17 patogénicos, restableciendo de este modo la tolerancia inmunológica durante la enfermedad autoinmune desmielinizante. Estos hallazgos proveen nuevas evidencias sobre el potencial del sistema galectinaglicanos en la capacidad regulatoria de CDs tolerogénicas y su empleo terapéutico en enfermedades autoinmunes mediadas por células Th1 y Th17.

■ LA ADMINISTRACIÓN TERAPÉUTICA DE GALECTINA-1 PREVIENE LA NEUROTOXICIDAD INDUCIDA POR LA MICROGLÍA ACTIVADA CLÁSICAMENTE Y DISMINUYE LOS FENÓMENOS DE NEURODEGENERACIÓN Y DESMIELINIZACIÓN EN EL SNC.

Diversas evidencias sugieren que la microglia activada y los macrófagos contribuyen a la neurodegeneración y disfunción neuronal en EM y EAE (Correale, 2011). El número de macrófagos/células de la microglia se correlaciona con la dimensión del daño axonal en lesiones de EM (Bitsch, 2000; Kutzelnigg & Lassmann, 2005; Rasmussen & Keegan, 2007) y con disfunción neuronal en EAE (Correale, 2011). La microglia y los macrófagos pueden ser activados por IFN- γ o LPS de tal forma que adquieren un fenotipo proinflamatorio (M1), mientras que estimulados por IL-4 o IL-13 adquieren un estado de activación alternativa (M2), el cual se asocia a funciones neuroprotectoras que promueven reparación axonal (Butovsky, 2006; Ponomarev, 2007). En un

microambiente inflamatorio, moneda corriente en la EM, los linfocitos $CD4^+$ se diferencian hacia un patrón Th1 y Th17 y secretan IFN- γ , TNF- α , IL-17 e IL-6. Estas citoquinas pueden inducir un daño directo de la vaina de mielina, promover la desmielinización mediada por acción celular y activar astrocitos, macrófagos y células microgliales hacia un perfil M1 que expresan aún más TNF- α en las lesiones activas. El IFN- γ también promueve la expresión de las moléculas de clase II del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) en las células gliales, induciendo así el proceso de presentación antigénica. Además, los macrófagos activados por los linfocitos Th1 (M1) participan activamente en el proceso de digestión de los componentes de la mielina (Sospedra & Martin, 2005; McFarland & Martin, 2007).

Se ha visto también que el proceso autoinmune que ocurre en la EM puede desencadenar procesos no mediados inmunológicamente que también contribuyen a la desmielinización. Por ejemplo, durante la EAE se ha descrito una elevación en los

niveles de óxido nítrico y los peroxinitros, dos sustancias citotóxicas. El principal responsable de dichos aumentos, la enzima óxido nítrico sintetasa, se encuentra presente en las placas activas de EM, donde la enzima inducible es expresada por macrófagos y células microgliales (Brosman, 1994).

Tal como describimos previamente, en la periferia Galectina-1 promueve la apoptosis selectiva de células Th1 y Th17 (Toscano, 2007), disminuye la capacidad de presentación antigénica y de producción de óxido nítrico por parte de macrófagos peritoneales y de bazo (Correa, 2003; Barrionuevo, 2007), inhibe el tráfico de leucocitos (Norling, 2008) y promueve la diferenciación de CDs tolerogénicas productoras de IL-27. Sin embargo, se desconocía si Galectina-1 ejercía algún rol directo sobre componentes del SNC. En este contexto, en los últimos años nos propusimos investigar si la glicosilación diferencial y las interacciones entre Galectina-1 y glicanos específicos podrían regular el compartimento de la microglia y los astrocitos en el SNC e influir en

la neurodegeneración inducida por inflamación. Así, demostramos que durante el curso de un proceso de neuroinflamación autoinmune, la expresión de Galectina-1 en el SNC es regulada de forma dinámica, particularmente en los astrocitos, en células T regulatorias Foxp3⁺ y en células de la microglia, lo cual es consistente con la función homeostática de esta lectina en el pico de la enfermedad neurodegenerativa desmielinizante (Starossom, 2012).

En condiciones normales, las células de la microglia se encuentran en reposo monitoreando el microambiente del SNC; sin embargo, en condiciones inflamatorias (Ponomarev, 2005) o ante una injuria (Davalos, 2005) estas células son activadas. Una vez activadas, la microglia es capaz de contribuir a la reparación o a la patología del SNC, dependiendo del microambiente que prevalezca y de su modo de activación (Streit, 2002; van Loo, 2006; Kigerl, 2009). Mientras que la microglia activada clásicamente (M1) estaría involucrada en la neurotoxicidad mediada por inflamación, la microglia activada alternativamente

(M2) tendría funciones neuroprotectoras (Streit, 2002). En este contexto, observamos que Galectina-1 regula negativamente la activación de la microglia M1 y promueve un fenotipo de activación alternativa de tipo M2.

Cuando analizamos este fenómeno *in vivo*, hallamos que tanto la transferencia adoptiva intracerebroventricular de astrocitos secretores de Galectina-1 como la administración directa de Galectina-1 recombinante al inicio de las manifestaciones clínicas de la enfermedad -cuando las células inflamatorias ya han arribado al SNC- lograron atenuar significativamente la severidad de la enfermedad e inhibieron la activación de la microglia en la médula espinal. De esta forma, desentrañamos un circuito regulatorio dentro del SNC a través del cual los astrocitos contribuyen a la resolución de la neuroinflamación mediante mecanismos de desactivación de la microglia gatillados por Galectina-1 (Figura 4). Estos resultados proponen que la terapia con Galectina-1 podría ser beneficiosa para disminuir la respuesta inflamatoria y la neuro-

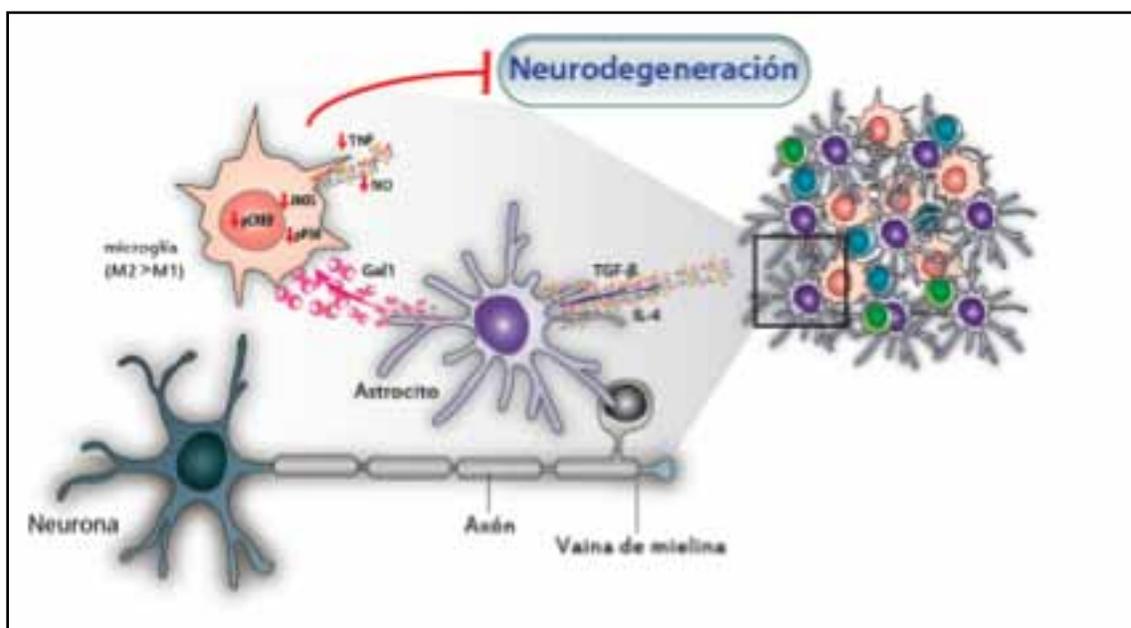


Figura 4. Circuito regulatorio mediado por Galectina-1 y glicanos capaz de desactivar la microglia y controlar procesos neurodegenerativos inducidos por inflamación.

patología afectando no sólo el compartimiento periférico (CDs y células T) sino también al SNC, a través de las células microgliales.

■ CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Una mejor comprensión de los mecanismos de activación, diferenciación y migración de células patogénicas responsables de las lesiones observadas en EM y EAE en conjunción con los recientes avances biotecnológicos en proteómica y genómica funcional han permitido en los últimos años importantes mejoras en el tratamiento de la enfermedad. En particular, se han invertido grandes esfuerzos en el diseño de tratamientos más selectivos que permitan controlar la enfermedad sin provocar una inmunosupresión generalizada. Inicialmente, la utilización de los diferentes tipos de interferones y el acetato de glatiramer cambiaron sustancialmente la visión de esta patología. Luego, la incorporación de la mitoxantrona contra las formas clínicas más agresivas y, ya en los últimos años, la llegada del Natalizumab como primer anticuerpo monoclonal utilizado en el tratamiento de la EM, sumaron nuevas herramientas terapéuticas (Correale, 2011). Sin embargo, todos estos nuevos fármacos tienen un efecto parcial y ninguno ha demostrado efectividad en ciertas formas clínicas de la enfermedad como aquellas primarias progresivas (Cohen & Rudick, 2007). Por lo tanto, es primordial el diseño racional de nuevas terapias que permitan inhibir la funcionalidad de células patogénicas en forma selectiva y en diferentes etapas de la enfermedad.

En un abordaje desde el modelado molecular hacia la clínica, en nuestro laboratorio intentamos capitalizar la información codificada por el 'glicoma' a los fines de diseñar

nuevas estrategias terapéuticas basadas en la interacción entre galectinas y glicanos para el tratamiento de enfermedades inflamatorias crónicas y autoinmunes siendo, en los últimos años, la EM nuestro eje central. A la luz de los últimos hallazgos, es posible anticipar nuevos horizontes terapéuticos en la enfermedad autoinmune desmielinizante, a través de los cuales la administración terapéutica de Galectina-1 permitiría atenuar la severidad de esta enfermedad a través de la eliminación selectiva de células Th1 y Th17 patogénicas y la activación de circuitos inmuno-regulatorios tanto a nivel periférico, mediante la inducción de CDs tolerogénicas productoras de IL-27 capaces de amplificar la población de células regulatorias Tr1 productoras de IL-10, como a nivel del SNC a través de la desactivación de la microglia por parte de los astrocitos.

■ BIBLIOGRAFÍA

Adams C.W., Poston R.N., Buk S.J. (1989). Pathology, histochemistry and immunocytochemistry of lesions in acute multiple sclerosis. *Journal of the Neurological Sciences* 92, 291-306.

Aktas O., Smorodchenko A., Brocke S., Infante-Duarte C., Schulze Topphoff U., Vogt J., Prozorovski T., Meier S., Osmanova V., Pohl E., Bechmann I., Nitsch R., Zipp F. (2005). Neuronal damage in autoimmune neuroinflammation mediated by the death ligand TRAIL. *Neuron* 46, 421-432.

Amano M., Galvan M., He J., Baum L.G. (2003). The ST6Gal I sialyltransferase selectively modifies N-glycans on CD45 to negatively regulate galectin-1-induced CD45 clustering, phosphatase modulation, and T cell death. *The Journal of Biological Chemistry* 278, 7469-7475.

Awasthi A., Carrier Y., Peron J.P.,

Bettelli E., Kamanaka M., Flavell R.A., Kuchroo V.K., Oukka M., Weiner H.L. (2007). A dominant function for interleukin 27 in generating interleukin 10-producing anti-inflammatory T cells. *Nature Immunology* 8, 1380-1389.

Barrionuevo P., Beigier-Bompadre M., Illarregui J.M., Toscano M.A., Bianco G.A., Isturiz MA, Rabinovich GA. (2007). A novel function for galectin-1 at the crossroad of innate and adaptive immunity: galectin-1 regulates monocyte/macrophage physiology through a nonapoptotic ERK-dependent pathway. *Journal of Immunology* 178, 436-445.

Baum L.G., Blackall D.P., Arias-Magallano S., Nanigian D., Uh S.Y., Browne J.M., Hoffmann D., Emmanouilides C.E., Territo M.C., Baldwin G.C. (2003). Amelioration of graft versus host disease by galectin-1. *Clinical Immunology* 109, 295-307.

Baxter A.G. (2007). The origin and application of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Nature Reviews Immunology* 7, 904-912.

Bettelli E., Oukka M., Kuchroo V.J. (2007). T(H)-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. *Nature Immunology* 8, 345-350.

Bitsch A., Schuchardt J., Bunkowski S., Kuhlmann T., Brück W. (2000). Acute axonal injury in multiple sclerosis. Correlation with demyelination and inflammation. *Brain* 123 (Pt 6), 1174-1183.

Blaser C., Kaufmann M., Müller C., Zimmermann C., Wells V., Mallucci L., Pircher H. (1998). Beta-galactoside-binding protein secreted by activated T cells inhibits antigen-induced proliferation of T cells. *European Journal of Immunology* 28, 2311-2319.

Blois S.M., Illarregui J.M., Tomet-

- ten M., Garcia M., Orsal A.S., Cordo-Russo R., Toscano M.A., Bianco G.A., Kobelt P., Handjiski B., Tirado I., Markert U.R., Klapp B.F., Poirier F., Szekeres-Bartho J., Rabinovich G.A., Arck P.C. (2007). A pivotal role for galectin-1 in fetomaternal tolerance. *Nature Medicine* 13, 1450-1457.
- Brosman C.F., Battistini L., Raine C.S., Dickson D.W., Casadevall A., Lee S.C. (1994). Reactive nitrogen intermediates in human neuropathology: an overview. *Developmental Neurosciences* 16, 152-161.
- Butovsky O., Landa G., Kunis G., Ziv Y., Avidan H., Greenberg N., Schwartz A., Smirnov I., Pollack A., Jung S., Schwartz M. (2006). Induction and blockage of oligodendrogenesis by differently activated microglia in an animal model of multiple sclerosis. *The Journal of Clinical Investigation* 116, 905-915.
- Chorny A., Gonzalez-Rey E., Fernandez-Martin A., Pozo D., Ganea D., Delgado M. (2005). Vasoactive intestinal peptide induces regulatory dendritic cells with therapeutic effects on autoimmune disorders. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 13562-13567.
- Chung C.D., Patel V.P., Moran M., Lewis L.A., Miceli M.C. (2000). Galectin-1 induces partial TCR zeta-chain phosphorylation and antagonizes processive TCR signal transduction. *Journal of Immunology* 165(7), 3722-3729.
- Coffman R.L. (2006). Origins of the T(H)1-T(H)2 model: a personal perspective. *Nature Immunology* 7, 539-541.
- Cohen J., Rudick R.A. (2007). *Multiple Sclerosis Therapeutics*. 3rd edition. London: Informa.
- Cooper D.N. (2002). Galectinomics: finding themes in complexity. *Biochimica et Biophysica Acta* 1572, 209-231.
- Correa S.G., Sotomayor C.E., Aoki M.P., Maldonado C.A., Rabinovich G.A. (2003). Opposite effects of galectin-1 on alternative metabolic pathways of L-arginine in resident, inflammatory, and activated macrophages. *Glycobiology* 13, 119-128.
- Correale J., Villa A.M., Garcea O. (2011). *Neuroinmunología Clínica*. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires 9, 127.
- Crisitano E., Patruco L., Rojas J.I. (2008) A systematic review of the epidemiology of multiple sclerosis in South America. *European Journal of Neurology* 15, 1273-1278.
- Crisitano E., Patruco L., Rojas J.I., Cáceres F., Carrá A., Correale J., Garcea O., Gold L., Tessler J., Kremenutzky M. (2009) Prevalence of multiple sclerosis in Buenos Aires, Argentina using capture-recapture method. *European Journal of Neurology* 16, 183-187.
- Cua D.J., Sherlock J., Chen Y., Murphy C.A., Joyce B., Seymour B., Lucian L., To W., Kwan S., Churakova T., Zurawski S., Wiekowski M., Lira S.A., Gorman D., Kastelein R.A., Sedgwick J.D. (2003). Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature* 421, 744-748.
- Daniels M.A., Hogquist K.A., Jameson S.C. (2002). Sweet 'n' sour: the impact of differential glycosylation on T cell responses. *Nature Immunology* 3, 903-910.
- Davalos D., Grutzendler J., Yang G., Kim J.V., Zuo Y., Jung S., Littman D.R., Dustin M.L., Gan W.B. (2005). ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nature Neuroscience* 8, 752-758.
- Demetriou M., Granovsky M., Quaggin S., Dennis J.W. (2001). Negative regulation of T-cell activation and autoimmunity by Mgat5 N-glycosylation. *Nature* 409, 733-739.
- Diestel A., Aktas O., Hackel D., Hake I., Meier S., Raine C.S., Nitsch R., Zipp F., Ullrich O. (2003). Activation of microglial poly(ADP-ribose)-polymerase-1 by cholesterol breakdown products during neuroinflammation: a link between demyelination and neuronal damage. *Journal of Experimental Medicine* 198, 1729-1740.
- Dyment D.A., Ebers G.C., Sadovnick A.D. (2004). Genetics of multiple sclerosis. *Lancet Neurology* 3, 104-110.
- Fitzgerald D.C., Zhang G.X., El-Behi M., Fonseca-Kelly Z., Li H., Yu S., Saris C.J., Gran B., Ciric B., Rostami A. (2007). Suppression of autoimmune inflammation of the central nervous system by interleukin 10 secreted by interleukin 27-stimulated T cells. *Nature Immunology* 8, 1372-1379.
- Gijbels K., Brocke S., Abram J.S., Steinman L. (1995). Administration of neutralizing antibodies to interleukin-6 (IL-6) reduces experimental autoimmune encephalomyelitis and is associated with elevated levels of IL-6 bioactivity in central nervous system and circulation. *Molecular Medicine* 1, 795-805.
- Glimcher L.H., Murphy K.M., (2000). Lineage commitment in the immune system: the T helper lymphocyte grows up. *Genes & Development* 14, 1693-1711.
- Guermonprez P., Valladeau J., Zitvogel L., Théry C., Amigorena S. (2002). Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annual Review of Immunology* 20, 621-667.
- Harrington L.E., Hatton R.D., Mangan P.R., Turner H., Murphy T.L., Murphy K.M., Weaver C.T. (2005). Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via

- a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nature Immunology* 6, 1123-1132.
- Hirabayashi J., Hashidate T., Arata Y., Nishi N., Nakamura T., Hirashima M., Urashima T., Oka T., Futai M., Muller W.E., Yagi F., Kasai K. (2002). Oligosaccharide specificity of galectins: a search by frontal affinity chromatography. *Biochimica et Biophysica Acta* 1572, 232-254.
- Illarregui J.M., Croci D.O., Bianco G.A., Toscano M.A., Salatino M., Vermeulen M.E., Geffner J.R., Rabinovich G.A. (2009). Tolerogenic signals delivered by dendritic cells to T cells through a galectin-1-driven immunoregulatory circuit involving interleukin 27 and interleukin 10. *Nature Immunology* 10, 981-991.
- Kigerl K.A., Gensel J.C., Ankeny D.P., Alexander J.K., Donnelly D.J., Popovich P.G. (2009). Identification of two distinct macrophage subsets with divergent effects causing either neurotoxicity or regeneration in the injured mouse spinal cord. *The Journal of Neuroscience* 29, 13435-13444.
- King C., Tangye S.G., Mackay C.R. (2008). T follicular helper (TFH) cells in normal and dysregulated immune responses. *Annual Review of Immunology* 26, 741-766.
- Kutzelnigg A., Lassmann H. (2005). Cortical lesions and brain atrophy in MS. *Journal of the Neurological Sciences* 233, 55-59.
- Kuchroo V.K., Anderson A.C., Waldner H., Munder M., Bettelli E., Nicholson L.B. (2002). T cell response in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE): role of self and cross-reactive antigens in shaping, tuning, and regulating the autopathogenic T cell repertoire. *Annual Review of Immunology* 20, 101-123.
- Lee S.U., Grigorian A., Pawling J., Chen I.J., Gao G., Mozaffar T., McKerlie C., Demetriou M. (2007). N-glycan processing deficiency promotes spontaneous inflammatory demyelination and neurodegeneration. *The Journal of Biological Chemistry* 282, 33725-33734.
- Leffler H., Carlsson S., Hedlund M., Qian Y., Poirier F. (2004). Introduction to galectins. *Glycoconjugate journal* 19, 433-440.
- Lock C., Hermans G., Pedotti R., Brendolan A., Schadt E., Garren H., Langer-Gould A., Strober S., Cannella B., Allard J., Klonowski P., Austin A., Lad N., Kaminski N., Galli S.J., Oksenberg J.R., Raine C.S., Heller R., Steinman L. (2002). Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis. *Nature Medicine* 8, 500-508.
- Lublin F.D., Reingold S.C. (1996). Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurology* 46, 907-911.
- Lunemann J.D., Kamradt T., Martin R., Münz C. (2007). Epstein-barr virus: environmental trigger of multiple sclerosis? *Journal of Virology* 81, 6777-6784.
- Matusevicius D., Kivisakk P., He B., Kostulas N., Ozenci V., Fredrikson S., Link H. (1999). Interleukin-17 mRNA expression in blood and CSF mononuclear cells is augmented in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis* 5, 101-104.
- McFarland H.F., Martin R. (2007). Multiple sclerosis: a complicated picture of autoimmunity. *Nature Immunology* 8, 913-919.
- Melcon M.O., Gold L., Carrá A., Cáceres F., Correale J., Cristiano E., Fernández Liguori N., Garcea O., Luetic G., Kremenchtzky M. (2008) Argentine Patagonia: prevalence and clinical features of multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis* 14, 656-662.
- Mendel I., Kerlero de Rosbo N., Ben-Nun A. (1995). A myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide induces typical chronic experimental autoimmune encephalomyelitis in H-2b mice: fine specificity and T cell receptor V beta expression of encephalitogenic T cells. *European Journal of Immunology* 25, 1951-1959.
- Morelli A.E., Rubin J.P., Erdos G., Tkacheva O.A., Mathers A.R., Zahorchak A.F., Thomson A.W., Falo L.D. Jr., Larregina A.T. (2005). CD4+ T cell responses elicited by different subsets of human skin migratory dendritic cells. *Journal of Immunology* 175, 7905-7915.
- Morelli A.E., Thomson A.W. (2007). Tolerogenic dendritic cells and the quest for transplant tolerance. *Nature Reviews Immunology* 7, 610-621.
- Mosmann T.R., Cherwinski H., Bond M.W., Giedlin M.A., Coffman R.L. (1986). Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *Journal of Immunology* 136, 2348-2357.
- Nogai A., Siffrin V., Bonhagen K., Pfueller C.F., Hohnstein T., Volkmer-Engert R., Brück W., Stadelmann C., Kamradt T. (2005). Lipopolysaccharide injection induces relapses of experimental autoimmune encephalomyelitis in nontransgenic mice via bystander activation of autoreactive CD4+ cells. *Journal of Immunology* 175, 959-966.
- Norling L.V., Sampaio A.L., Cooper D., Perretti M. (2008). Inhibitory control of endothelial galectin-1 on in vitro and in vivo lymphocyte trafficking. *Faseb Journal* 22, 682-690.

- Olsson T. (1992). Immunology of multiple sclerosis. *Current Opinion in Neurology and Neurosurgery* 5, 195-202.
- Perillo N.L., Pace K.E., Seilhamer J.J., Baum L.G. (1995). Apoptosis of T cells mediated by galectin-1. *Nature* 378, 736-739.
- Perone M.J., Bertera S., Tawadrous Z.S., Shufesky W.J., Piganelli J.D., Baum L.G., Trucco M., Morelli A.E. (2006). Dendritic cells expressing transgenic galectin-1 delay onset of autoimmune diabetes in mice. *Journal of Immunology* 177, 5278-5289.
- Ponomarev E.D., Shriver L.P., Maresz K., Dittel B.N. (2005). Microglial cell activation and proliferation precedes the onset of CNS autoimmunity. *Journal of Neuroscience Research* 81, 374-389.
- Ponomarev E.D., Shriver L.P., Maresz K., Pedras-Vasconcelos J., Verthelyi D., Dittel B.N. (2007). GM-CSF production by autoreactive T cells is required for the activation of microglial cells and the onset of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Immunology* 178, 39-48.
- Prineas J.W., Raine C.S. (1976). Electron microscopy and immunoperoxidase studies of early multiple sclerosis lesions. *Neurology* 26 (6 PT 2), 29-32.
- Rabinovich G.A. (2004). Inmunopatología molecular: nuevas fronteras de la medicina. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires Capítulo 59, 585.
- Rabinovich G.A., Toscano M.A. (2009). Turning "sweet" on immunity: Galectin-glycan interactions in immune tolerance and inflammation. *Nature Reviews Immunology* 9, 338-352.
- Rabinovich G.A., Liu F.T., Hirashima M., Anderson A. (2007). An emerging role for lectins in tuning the immune response: lessons from experimental models of inflammatory disease, autoimmunity and cancer. *Scandinavian Journal of Immunology* 66, 143-158.
- Rabinovich G.A., Modesti N.M., Castagna L.F., Landa C.A., Riera C.M., Sotomayor C.E. (1997). Specific inhibition of lymphocyte proliferation and induction of apoptosis by CLL-1, a beta-galactoside-binding lectin. *Journal of Biochemistry* 122, 365-373.
- Rabinovich G.A., Iglesias M.M., Modesti N.M., Castagna L.F., Wolfenstein-Todel C., Riera C.M., Sotomayor C.E. (1998). Activated rat macrophages produce a galectin-1-like protein that induces apoptosis of T cells: biochemical and functional characterization. *Journal of Immunology* 160, 4831-4840.
- Rabinovich G.A., Ramhorst R.E., Rubinstein N., Corigliano A., Daroqui M.C., Kier-Joffé E.B., Fainboim L. (2002). Induction of allogenic T-cell hyporesponsiveness by galectin-1-mediated apoptotic and non-apoptotic mechanisms. *Cell Death and Differentiation* 9, 661-670.
- Rabinovich G.A., Ariel A., Hershkovich R., Hirabayashi J., Kasai K.I., Lider O. (1999). Specific inhibition of T-cell adhesion to extracellular matrix and proinflammatory cytokine secretion by human recombinant galectin-1. *Immunology* 97, 100-106.
- Rasmussen K.G., Keegan B.M. (2007). Electroconvulsive therapy in patients with multiple sclerosis. *The Journal of ECT* 23, 179-180.
- Reiner S.L. (2009). Decision making during the conception and career of CD4+ T cells. *Nature Reviews Immunology* 9, 81-82.
- Reis e Sousa C. (2006). Dendritic cells in a mature age. *Nature Reviews Immunology* 6(6), 476-483.
- Roncarolo M.G., Levings M.K. (2000). The role of different subsets of T regulatory cells in controlling autoimmunity. *Current Opinion in Immunology* 12, 676-683.
- Rudick R.A., Trapp B.D. (2009). Gray-matter injury in multiple sclerosis. *The New England Journal of Medicine* 361, 1505-1506.
- Rutella S., Bonanno G., Procoli A., Mariotti A., de Ritis D.G., Curti A., Danese S., Pessina G., Pandolfi S., Natoni F., Di Febo A., Scambia G., Manfredini R., Salati S., Ferrari S., Pierelli L., Leone G., Lemoli R.M. (2006). Hepatocyte growth factor favors monocyte differentiation into regulatory interleukin (IL)-10++IL-12low/neg accessory cells with dendritic-cell features. *Blood* 108, 218-227.
- Rutella S., Danese S., Leone G. (2006). Tolerogenic dendritic cells: cytokine modulation comes of age. *Blood* 108, 1435-1440.
- Santucci L., Fiorucci S., Rubinstein N., Mencarelli A., Palazzetti B., Federici B., Rabinovich G.A., Morelli A. (2003). Galectin-1 suppresses experimental colitis in mice. *Gastroenterology* 124, 1381-1394.
- Sato S., Nieminen J. (2004). Seeing strangers or announcing "danger": galectin-3 in two models of innate immunity. *Glycoconjugate Journal* 19, 583-591.
- Siffrin V., Brandt A.U., Herz J., Zipp F. (2007). New insights into adaptive immunity in chronic neuroinflammation. *Advances in Immunology* 96, 1-40.
- Sospedra M., Martin R. (2005). Antigen-specific therapies in multiple sclerosis. *International Reviews of Immunology* 24, 393-413.
- Sospedra M., Martin R. (2005). Immunology of multiple sclerosis. *Annual Review of Immunology* 23, 683-747.
- Storosso S.C., Mascanfroni I.D., Imitola J., Cao L., Raddassi K.,

- Hernandez S.F., Bassil R., Croci D.O., Cerliani J.P., Delacour D., Wang Y., Elyaman W., Houry S.J., Rabinovich G.A. (2012). Galectin-1 deactivates classically activated microglia and protects from inflammation-induced neurodegeneration. *Immunity* 37, 249-63.
- Steinman R.M. (2007). Dendritic cells: understanding immunogenicity. *European Journal of Immunology* 37 Suppl 1: S53-60.
- Steinman R.M., Hawiger D., Nussenzweig M.C. (2003). Tolerogenic dendritic cells. *Annual Review of Immunology* 21, 685-711.
- Steinman L. (1996). Multiple sclerosis: a coordinated immunological attack against myelin in the central nervous system. *Cell* 85, 299-302.
- Streit W.J. (2002). Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the CNS. *Glia* 40, 133-139.
- Stromnes I.M., Goverman J.M. (2006). Active induction of experimental allergic encephalomyelitis. *Nature Protocols* 1, 1810-1819.
- Stromnes I.M., Goverman J.M. (2006). Passive induction of experimental allergic encephalomyelitis. *Nature Protocols* 1, 1952-1960.
- Stromnes I.M., Cerretti, L.M., Liggitt D., Harris R.A., Goverman J.M. (2008). Differential regulation of central nervous system autoimmunity by T(H)1 and T(H)17 cells. *Nature Medicine* 14, 337-342.
- Stumhofer J.S., Laurence A., Wilson E.H., Huang E., Tato C.M., Johnson L.M., Villarino A.V., Huang Q., Yoshimura A., Sehy D., Saris C.J., O'Shea J.J., Hennighausen L., Ernst M., Hunter C.A. (2006). Interleukin 27 negatively regulates the development of interleukin 17-producing T helper cells during chronic inflammation of the central nervous system. *Nature Immunology* 7, 937-945.
- Stumhofer J.S., Silver J.S., Laurence A., Porrett P.M., Harris T.H., Turka L.A., Ernst M., Saris C.J., O'Shea J.J., Hunter C.A. (2007). Interleukins 27 and 6 induce STAT3-mediated T cell production of interleukin 10. *Nature Immunology* 8(12), 1363-1371.
- Svensson M., Maroof, A., Ato M., Kayo P.M. (2004). Stromal cells direct local differentiation of regulatory dendritic cells. *Immunity* 21, 805-816.
- Toscano M.A., Commodaro A.G., Illarregui J.M., Bianco G.A., Liberman A., Serra H.M., Hirabayashi J., Rizzo L.V., Rabinovich G.A. (2006). Galectin-1 suppresses autoimmune retinal disease by promoting concomitant Th2- and T regulatory-mediated anti-inflammatory responses. *Journal of Immunology* 176, 6323-6332.
- Toscano M.A., Bianco G.A., Illarregui J.M., Croci D.O., Correale J., Hernandez J.D., Zwirner N.W., Poirier F., Riley E.M., Baum L.G., Rabinovich G.A. (2007). Differential glycosylation of TH1, TH2 and TH-17 effector cells selectively regulates susceptibility to cell death. *Nature Immunology* 8, 825-834.
- Trapp B.D., Peterson J., Ransohoff R.M., Rudick R., Mörk S., Bö L. (1998). Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *The New England Journal of Medicine* 338, 278-285.
- Trifari S., Kaplan C.D., Tran E.H., Crellin N.K., Spits H. (2009). Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from T(H)-17, T(H)1 and T(H)2 cells. *Nature Immunology* 10, 864-871.
- Vaknin-Dembinsky A., Balashov K., Weiner H.L. (2006). IL-23 is increased in dendritic cells in multiple sclerosis and down-regulation of IL-23 by antisense oligos increases dendritic cell IL-10 production. *Journal of Immunology* 176, 7768-7774.
- van Loo G., De Lorenzi R., Schmidt H., Huth M., Mildner A., Schmidt-Supprian M., Lassmann H., Prinz M.R., Pasparakis M. (2006). Inhibition of transcription factor NF-kappaB in the central nervous system ameliorates autoimmune encephalomyelitis in mice. *Nature Immunology* 7, 954-961.
- Veldhoen M., Uyttenhove C., van Snick J., Helmby H., Westendorf A., Buer J., Martin B., Wilhelm C., Stockinger B. (2008). Transforming growth factor-beta 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. *Nature Immunology* 9, 1341-1346.
- Veldhoen M., Hocking R.J., Atkins C.J., Locksley R.M., Stockinger B. (2006). TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* 24, 179-189.
- Viglietta V., Baecher-Allan C., Weiner H.L., Hafler D.A. (2004). Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *Journal of Experimental Medicine* 199, 971-979.
- Wakkach A., Fournier N., Brun V., Breittmayer J.P., Cottrez F., Groux H. (2003). Characterization of dendritic cells that induce tolerance and T regulatory 1 cell differentiation in vivo. *Immunity* 18, 605-617.
- Weiner H.L. (2009). The challenge of multiple sclerosis: how do we cure a chronic heterogeneous disease? *Annals of Neurology* 65, 239-248.
- Zamvil S.S., Steinman L. (1990). The T lymphocyte in experimental allergic encephalomyelitis. *Annual Review of Immunology* 8, 579-621.

El 98 por ciento de los doctores formados por el CONICET tiene empleo

Según un informe dado a conocer por este organismo científico acerca de la inserción de doctores, sólo un 1 por ciento de estos ex-becarios no tiene trabajo o no poseen ocupación declarada y un 10 por ciento posee remuneraciones inferiores a un estipendio de una beca doctoral.

Asimismo, proyecta que el 89 por ciento de los encuestados tiene una situación favorable en su actividad profesional, pero sobre todo asegura que más del 98 por ciento de los científicos salidos del CONICET consigue trabajo.

Los datos surgidos del estudio "Análisis de la inserción laboral de los ex-becarios Doctorales financiados por CONICET", realizado por la Gerencia de Recursos Humanos del organismo, involucró 934 casos sobre una población de 6.080 ex-becarios entre los años 1998 y el 2011.

Al respecto, en el mismo se considera que del número de ex-becarios consultados, el 52 por ciento (485 casos), continúa en el CONICET en la Carrera del Investigador Científico y Tecnológico.

De los que no ingresaron en el organismo pero trabajan en el país, sobre 341 casos, el 48 por ciento se encuentra empleado en universidades de gestión pública y un 5 por ciento en privadas; el 18 por ciento en empresas, un 6 por ciento en organismos de Ciencia y Técnica (CyT), un 12 por ciento en la gestión pública y el resto en instituciones y organismos del Estado.

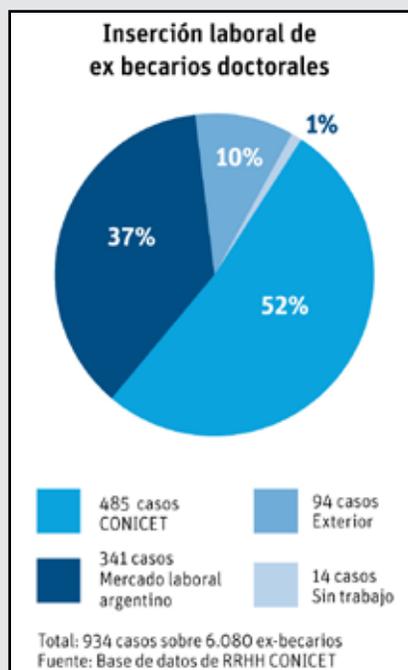
En tanto, en el extranjero, sobre 94 casos, el 90 por ciento trabaja en universidades, el 7 por ciento en empresas y el 2 por ciento es autónomo.

El mismo informe traduce que la demanda del sector privado sobre la

incorporación de doctores no es aún la esperada, pero está creciendo. La inserción en el Estado, si se suma a las universidades nacionales y ministerios, se constituye en el mayor ámbito de actividad.

Frente a ello, a los fines de avanzar en la inserción en el ámbito publico-privado el CONICET realiza actividades políticas de articulación con otros organismos de CyT, es decir, universidades, empresas, a través de la Unión Industrial Argentina (UIA), y en particular con YPF que requiere personal altamente capacitado en diferentes áreas de investigación.

Desde el CONICET se espera que en la medida que la producción argentina requiera más innovación, crecerá la demanda de doctores. Para cuando llegue ese momento el país deberá tener los recursos humanos preparados para dar respuestas. Es por ello se piensa en doctores para el país y no solamente doctores para el CONICET.



Programa +VALOR.DOC

Sumar doctores al desarrollo del país

A través de esta iniciativa nacional, impulsada por el CONICET y organismos del Estado, se amplían las posibilidades de inserción laboral de profesionales con formación doctoral

El programa +VALOR.DOC bajo el lema "Sumando Doctores al Desarrollo de la Argentina", busca vincular los recursos humanos con las necesidades y oportunidades de desarrollo del país y fomentar la incorporación de doctores a la estructura productiva, educativa, administrativa y de servicios.

A partir de una base de datos y herramientas informáticas, se aportan recursos humanos altamente calificados a la industria, los servicios y la gestión pública. Mediante una página Web, los doctores cargan sus curriculum vitae para que puedan contactarlos por perfil de formación y, de esta manera, generarse los vínculos necesarios.

Con el apoyo del Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva, este programa tiene como objetivo reforzar las capacidades científico-tecnológicas de las empresas, potenciar la gestión y complementar las acciones de vinculación entre el sector que promueve el conocimiento y el productivo.

+VALOR.DOC es una propuesta interinstitucional que promueve y facilita la inserción laboral de doctores que por sus conocimientos impactan positivamente en la sociedad.

Para conocer más sobre el programa www.masVALORDoc.conicet.gov.ar.

ENFERMEDAD CELÍACA: una inmunopatología muy frecuente pero poco conocida

Palabras clave: enfermedad celíaca, inmunopatología, intestino delgado, gluten.
Key words: coeliac disease, immunopathology, small intestine, gluten.

La Enfermedad Celíaca (EC) es una enteropatía crónica de base inmunológica, en la que intervienen mecanismos tanto de la inmunidad innata como adaptativa. La presentación clínica es altamente variable, desde cuadros gastrointestinales característicos hasta formas oligo o asintomáticas. La prevalencia de EC es muy elevada (cerca al 1%), sin embargo, se encuentra fuertemente subdiagnosticada por falta de conocimiento y de estrategias de búsqueda adecuadas. Los pacientes no diagnosticados y por lo tanto no tratados tienen consecuencias severas, muchas de ellas irreversibles, que reducen su calidad de vida y capacidad laboral. En individuos susceptibles, la patología sólo se desarrolla en presencia de un antígeno dietario denominado gluten y constituido mayoritariamente por un grupo de proteínas de trigo, cebada, centeno y avena, denominadas gliadinas o gluten. La ingesta de estas proteínas produce alteración histológica en la mucosa del intestino delgado y pérdida de la función de absorción de nutrientes. Existen varias enfermedades fuertemente asociadas a la EC, en particular

aquellas con componentes autoinmunes como diabetes mellitus tipo I y artritis reumatoidea. La susceptibilidad a desarrollar EC está asociada a la presencia de determinados alelos del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH), en particular HLA-DQ2 y DQ8 los que están presentes en casi la totalidad de los pacientes. La expansión y activación de linfocitos T específicos de péptidos derivados del gluten y la abundante producción de IFN- γ son los elementos más característicos de la respuesta adaptativa en la mucosa intestinal. Por otra parte, la inmunidad innata se manifiesta frente a ciertos péptidos derivados de gliadinas que inducen mecanismos proinflamatorios. Aunque en la actualidad se conocen con detalle múltiples aspectos de la patogenia de EC que han permitido una mejora de la detección temprana de los pacientes y la profundización en el conocimiento del rol del sistema inmune en la mucosa intestinal, aún existen importantes desafíos para los investigadores. A lo largo de esta revisión presentaremos y discutiremos varios de los hallazgos que han mejorado el diagnóstico de la enfermedad y, consecuentemente, la calidad de vida de los pacientes.

Celiac disease (CD) is a chronic enteropathy induced by the immune system where mechanisms of both innate and adaptive immunity are involved. The clinical presentation is highly variable, ranging from the characteristic gastrointestinal syndrome to oligo- or asymptomatic forms. The prevalence of CD is high (close to 1%), though the disease is underdiagnosed due to lack of knowledge and appropriate case-finding strategies. Undiagnosed patients, and therefore not treated, may have a higher risk of complications, some of them irreversible, which reduce the quality of life and working ability. In susceptible individuals, the disease is only developed when a dietary antigen called gluten is ingested (gluten is constituted by a group of proteins from wheat, barley, rye and oats, generally known as gliadins and gluten). The ingestion of these proteins leads to the histological lesion in the small bowel mucosa and the loss of absorptive function by the epithelium. Several diseases associated to CD have been described, particularly those with an autoimmune aetiology, such as diabetes mellitus type I or rheumatoid arthritis. Susceptibility to develop CD is associated with the presence of discrete alleles of the major histocompatibility complex (MHC), in particular HLA-DQ2 or DQ8, which are found in almost all CD patients. The expansion and activation of T cells specific for gluten-derived peptides and the increased production of IFN- γ in the intestinal mucosa are the most characteristic elements of the adaptive response to gluten. On the other hand, innate immunity is triggered by certain gliadin peptides which induce proinflammatory mechanisms. Although currently many aspects of the pathogenesis of CD are known, which has allowed a better early detection of patients and contributed to a deeper understanding of the role of the mucosal immune system, there are still many challenges for researchers. Along this review, we present and discuss different findings that have improved the diagnosis of the disease and, consequently, the quality of life of patients.

■ Fernando G. Chirido¹ y Eduardo Arranz²

¹ Laboratorio de Investigación en el Sistema Inmune- LISIN. Departamento de Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de La Plata. La Plata. Argentina. fchirido@biol.unlp.edu.ar

² Instituto de Biología y Genética Molecular (IBGM), Universidad de Valladolid-CSIC. Facultad de Medicina. Universidad de Valladolid. Valladolid. España. earranz@med.uva.es

■ ENFERMEDAD CELÍACA. DEFINICIONES Y PRESENTACIÓN CLÍNICA.

La Enfermedad Celíaca (EC) es una enteropatía crónica de base inmunológica inducida en individuos genéticamente susceptibles por un componente dietario, un grupo de proteínas de trigo, cebada, centeno y avena, al que por sus características bioquímicas y funcionales se las denomina gluten (Abadie V. et al., 2011).

El término celíaco proviene del griego *koiliakos* y hace referencia al abdomen. La EC fue reconocida como una patología del tracto digestivo por el médico griego Aretaeus, aproximadamente hacia el año 100 de la era cristiana. Sin embargo, la

relación con la dieta fue establecida a comienzos de la década de 1950 por el pediatra holandés W. Dicke, quien propuso la dieta libre de gluten (DLG) como tratamiento. La presentación clínica de EC es altamente variable así como la edad de aparición de los síntomas. En pediatría, se observan comúnmente signos de desnutrición, diarrea, retraso de crecimiento que, en conjunto, pueden conducir a distintos déficit de desarrollo algunos irreversibles. A mayor edad se puede observar manifestaciones digestivas (diarrea, dolor abdominal, dispepsia, flatulencia, pirosis, constipación) y también diferentes manifestaciones extraintestinales y hematológicas (anemia ferropénica, otras anemias por déficit de folato o vitamina B12, trombocitopenias) que se pueden presentar

en formas oligo o monosintomáticas (Green PH & Cellier C. 2007; Lewis NR & Holmes G., 2010). Los signos son variados, en muchos casos difusos y difieren al evaluar población pediátrica y adulta. Por esta razón, el grado de conocimiento y alerta de los profesionales de la salud debe ser elevado para permitir la detección de EC cuando ésta no tiene una manifestación evidente.

Hay un conjunto de enfermedades, muchas de ellas autoinmunes, que están fuertemente asociadas a la EC por lo que es posible encontrar dichas patologías en forma concomitante en pacientes celíacos. Entre estas patologías se encuentran la diabetes mellitus tipo I, la artritis reumatoidea y la tiroiditis autoinmune (Merese B. et al., 2012). Otros

Tabla 1. Presentación Clínica

Grupo de Edad	Síntomas	Signos
Niños	Diarrea crónica Dolores abdominales Vómitos Anorexia Apatía Mal humor	Malnutrición Distensión abdominal Retraso pondero-estatural Hipotrofia muscular Ferropenia Hipoproteinemia Aftas recurrentes, defectos dentales
Adolescentes y Pre-adolescentes	Oligosintomáticos Dolor abdominal Diarrea, constipación Retraso desarrollo puberal Alteraciones menstruales Cefaleas Artralgias	Talla baja Ferropenia Debilidad muscular Osteopenia
Adultos	Síntomas digestivos inespecíficos: (dispepsia, diarrea, vómitos, constipación) Pérdida de peso Sintomatología osteo-muscular. Infertilidad, aborto recurrente Alteraciones neurológicas: (Parestesias, Tetania, Ataxia, Epilepsia) Alteraciones psiquiátricas: (depresión, irritabilidad, astenia)	Malnutrición Ferropenia Hipoalbuminemia Alteraciones en la coagulación Déficits vitamínicos Hipertransaminasemia Neuropatía periférica Miopatías Hipoesplenismo Aftas bucales Osteoporosis y osteopenia

casos de asociación con la EC se observan en el Síndrome de Down y en pacientes con una inmunodeficiencia primaria denominada déficit selectivo de IgA. En conjunto, todas estas patologías presentan una asociación entre el 1 y 5%, respectivamente. Es decir, ambas patologías se presentan en forma conjunta en una frecuencia mayor que la que se encontraría si fueran independientes. Este conocimiento es relevante tanto para la etapa diagnóstica como en el tratamiento.

Debido al rol de los alelos de HLA y la contribución de varios genes (ver más adelante) existe un fuerte impacto en la susceptibilidad cuando se consideran los familiares de primer grado de un paciente celíaco. Se estima que el 10% de los parientes de primer grado de un paciente celíaco presentan EC lo que constituye también un elemento de relevancia en el diagnóstico.

Las formas más clásicas de EC se presentan, como hemos mencionado, con diferentes signos clínicos, serología positiva y alteraciones histológicas en la mucosa intestinal. Sin embargo, también se observan otras situaciones que dificultan tomar una decisión diagnóstica. En ciertos casos, definidos como la EC silente, se encuentran pacientes con serología positiva y alteraciones histológicas características pero que no presentan síntomas. Mientras que en otros, condición denominada EC latente o potencial, se observa serología positiva con histología normal, aunque también puede encontrarse infiltrado linfocitario y, especialmente, incremento en el número de linfocitos intraepiteliales (Ferguson et al. 1993, Arranz et al. 1994).

Tabla 2. Enfermedades y Condiciones Asociadas a Enfermedad Celíaca	
Enfermedades de base inmunológica	Trastornos neurológicos y psiquiátricos
Diabetes tipo I	Encefalopatía progresiva
Artritis reumatoidea	Síndromes cerebelosos
Tiroiditis autoinmune	Demencia con atrofia cerebral
Déficit selectivo de IgA	Leucoencefalopatía
Enfermedad de Addison	Epilepsia y calcificaciones cerebrales
Enfermedad inflamatoria Intestinal	Otros asociaciones
Síndrome de Sjögren	Síndrome de Down
Lupus eritematoso sistémico	Síndrome de Williams
Hepatitis autoinmune	Cistinuria
Nefropatía por IgA	Síndrome de Turner
Cirrosis biliar primaria	Enfermedad de Hartnup
Psoriasis, vitíligo y alopecia areata	Colitis microscópica

■ PREVALENCIA Y PROTOCOLOS PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA EC

La EC es una de las patologías de base inmunológica de mayor frecuencia. La prevalencia estimada de EC en población general es del 1%. Los estudios de prevalencia más extensos han sido realizados en países europeos y aunque se dispone de menos información en otras regiones, en todos los casos la estimación general es similar. Un hallazgo común en estos estudios, en especial aquellos que evalúan la población adulta, es el alto número de pacientes oligosintomáticos o asintomáticos (Rampertab SD et al, 2006; Cattassi C et al. 2007). El único estudio realizado con el objetivo de evaluar la prevalencia de EC en población adulta en Argentina fue realizado en la ciudad de La Plata (Gomez JC, et al. 2001, 2002). Allí se encontró una prevalencia de 1:144, siendo asintomáticos el 70% de los pacientes celíacos detectados.

El protocolo para el diagnóstico de EC consiste en la evaluación clínica, determinación de los niveles séricos de anticuerpos específicos y evaluación histológica de piezas de biopsias de intestino delgado. Sólo una vez completada la etapa del diagnóstico de EC se indica la dieta libre de gluten. La remisión clínica en respuesta a la dieta de exclusión de gluten es considerada un elemento de confirmación del diagnóstico de EC.

Aunque la EC es una patología de alta prevalencia se encuentra fuertemente subdiagnosticada. Esto es consecuencia de su presentación altamente variable siendo muy común las formas oligo o asintomáticas. Por lo tanto, la sospecha de EC a partir de signos del propio paciente es, en muchos casos, baja. En general, la detección de EC en pacientes asintomáticos se logra mediante estrategias de búsqueda a partir de la familiaridad de un primer caso o por

técnicas de "screening" poblacional abierto u orientado, por ejemplo, a patologías asociadas.

Como mencionamos, la prevalencia de EC en la población general es del 1%. Sin embargo, si se estudian aquellos individuos que asisten a consulta médica o derivados a endoscopia por síntomas que, en principio, no fueron relacionados con EC, la prevalencia estimada podría ser mayor. Esta observación destaca la importancia de la observación endoscópica y de mantener un elevado grado de alerta en la detección de EC en aquellas formas oligosintomáticas no clásicas.

Aunque no existe un consenso internacional sobre un protocolo diagnóstico, comúnmente la secuencia en la evaluación de EC consiste en realizar los estudios de serología en aquellos pacientes con sospecha clínica y la toma de biopsias de intestino en aquellos con serología positiva. Como veremos luego, existen otros estudios que brindan información complementaria de utilidad principalmente en aquellos casos con difícil resolución. Cabe recordar que aun cuando la eficiencia analítica de los ensayos de serología se ha incrementado sustancialmente, los hallazgos histológicos son los que definen el diagnóstico de EC.

- Evaluación Histológica. El diagnóstico de confirmación de EC requiere el análisis histológico de secciones de biopsias de intestino delgado. Durante la videoendoscopia para la toma de la biopsia, la visualización de signos en el intestino delgado proximal como pliegues festoneados, fisuras, patrón en mosaico, patrón nodular, disminución del número y altura de los pliegues o vasos visibles son sugestivos de la presencia de EC (Ravelli AM. et al 2001; Brocchi E. et al. 2002).

Siendo el intestino delgado proximal la región afectada en la EC, las piezas de biopsias son tomadas de bulbo y de segunda porción. En general, se toman tres piezas de biopsia para el examen histológico ya que es común observar diferencias relevantes entre las distintas regiones. El hallazgo de alteraciones en la estructura histológica reflejadas como reducción de la altura de las vellosidades, aumento de la profundidad de criptas, infiltrado linfocitario en *lamina propria* y aumento del número de linfocitos intraepiteliales, caracterizan las observaciones más comunes en EC activa (Marsh MN., 1992; Oberhuber G. et al. 1999). Estos hallazgos indican sin duda una enteropatía severa (en muchos casos, denominada atrofia total o parcial). Sin embargo, la mayor complejidad en cuanto a la interpretación de la histología se encuentra en aquellos casos donde se observan alteraciones menores o sólo alguno de los rasgos mencionados. En estos casos, se requiere una ponderación de las alteraciones observadas en conjunto con otros elementos diagnósticos o considerar una reevaluación posterior del paciente.

- Estudios serológicos. El curso del protocolo diagnóstico a partir de la sospecha clínica, familiaridad o la presencia de enfermedades asociadas conduce, por lo general, a los estudios serológicos. Desde la década del '70 se realizan estudios de búsqueda de marcadores (anticuerpos) en sangre periférica. Se emplearon técnicas de ELISA para la detección de anticuerpos anti-gliadinas o de inmunofluorescencia indirecta para los anticuerpos anti-endomisio. La utilidad particular de la determinación de los anticuerpos anti-endomisio se basa en su altísima especificidad. Nuevos desarrollos han generado métodos comerciales que evalúan la presencia de anticuerpos anti-gliadinas deamida-

das y anticuerpos anti-transglutaminasa 2 (TG2). Estos nuevos ensayos tienen eficiencias paramétricas muy superiores y permiten una mejora significativa en la capacidad efectiva de detección de EC (Vermeersch P. et al., 2012).

En la actualidad, los estudios serológicos consisten en la determinación de anticuerpos: anti-TG2, anti-endomisio y anti-gliadinas deamidadas. No existe un consenso sobre una estrategia de aplicación de estos ensayos. Dependiendo de la accesibilidad de cada método u organización de cada centro de salud, los ensayos pueden realizarse en una sola etapa o en forma secuencial. A su vez, deben determinarse los niveles de IgA sérica con el fin de evitar los resultados falsos negativos en los pacientes con déficit selectivo de IgA (condición asociada a la EC).

- Estudios complementarios. Con diferente grado de aplicabilidad se ha propuesto la determinación de los alelos de susceptibilidad de HLA (DQ2/DQ8) y la determinación de los depósitos de IgA anti-TG2/TG2 en la mucosa intestinal.

Mencionamos que los alelos de susceptibilidad contribuyen significativamente al riesgo de EC. Casi la totalidad de los pacientes celíacos expresan HLA-DQ2 (DQA*0501, DQB*0201) o DQ8 (DQA*0301, DQB*0301) siendo ésta la patología con índice de riesgo relativo más elevado. La detección de estos alelos se realiza mediante ensayos de amplificación específica por PCR a partir de ADN obtenido de células de sangre periférica y posterior análisis del producto obtenido mediante distintas técnicas. La determinación de los alelos DQ2/DQ8 es de utilidad ya que en los casos positivos refuerza el diagnóstico de la EC y en los casos negativos, donde tiene un elevado impacto por su valor predic-

tivo negativo, es un fuerte indicador para la exclusión de EC (Sollid LM. and Lie BA. 2005; Piccini B., et al 2012).

Aunque la determinación de HLA es, sin duda, un elemento complementario muy importante en el diagnóstico de EC, su aplicabilidad se ve limitada por aspectos logísticos (requerimiento de equipamiento especial no disponible aún en las Unidades de Salud en forma extendida) y por su elevado costo.

Además del análisis histológico convencional se han realizado ensayos por inmunohistoquímica para identificar linfocitos T CD3⁺. De esta manera, es sencillo evidenciar el infiltrado linfocitario en la *lamina propria* y en el compartimiento intraepitelial en los casos donde la alteración histológica es muy leve. Sin embargo, una prueba de inmunohistoquímica que parece tener una elevada eficiencia predictiva positiva es la colocalización de TG2 y anticuerpos de clase IgA. Estos llamados depósitos de inmunocomplejos IgA anti-TG2/TG2 son altamente selectivos de EC y pueden ser muy útiles como prueba complementaria en el diagnóstico.

El diagnóstico temprano de EC y su correspondiente tratamiento (introducción de una dieta estricta libre de gluten) evita el desarrollo de trastornos metabólicos y nutricionales, mejora la calidad de vida, y reduce las complicaciones a largo plazo. Las situaciones donde la dieta no genera un cambio favorable son verdaderamente escasas y consecuencia, generalmente, de la presencia de neoplasias (la más comúnmente encontrada es el linfoma T asociado a intestino).

■ MECANISMOS DE PATOGENIA DE LA EC

En la mucosa intestinal se desarrollan dos tipos de respuesta inmune que están estrechamente vinculados. La fase crónica se caracteriza por la presencia de linfocitos T CD4⁺ que producen IFN-g, citoquina responsable de gran parte de los mecanismos de daño en la mucosa. Estos linfocitos Th1 son específicos de péptidos derivados de gluten presentados por células dendríticas en las moléculas HLA-DQ2 o DQ8. Por otro lado, existen otros péptidos derivados de gluten, como el p31-43, que inducen mecanismos proinflamatorios independientes de células T que, entre otros efectos, alteran la

unión estrecha entre enterocitos y generan aumento en la permeabilidad intestinal.

Características de las proteínas de los cereales tóxicos

Debido a las propiedades bioquímicas de sus proteínas el trigo es el cereal más ampliamente usado en la alimentación humana. El amasado conduce a la formación de una estructura viscoelástica que atrapa gas, denominada gluten, generada por el entrecruzamiento covalente mediante puentes disulfuro entre gliadinas y gluteninas. La masa obtenida es la base de gran parte de nuestra alimentación siendo empleada también en el desarrollo de productos altamente tecnificados con el fin de lograr ciertas características de calidad.

Los cereales tóxicos: trigo (*Triticum aestivum* L.), cebada (*Hordeum vulgare* L.) y centeno (*Secale cereale* L.) están evolutivamente relacionados, pertenecen a la tribu *Triticeae* y presentan grupos de proteínas con alta homología así como propiedades fisicoquímicas similares. La avena en cambio, si bien se encuentra en la misma subfamilia, pertenece a la tribu *Aveneae* y presenta algunas

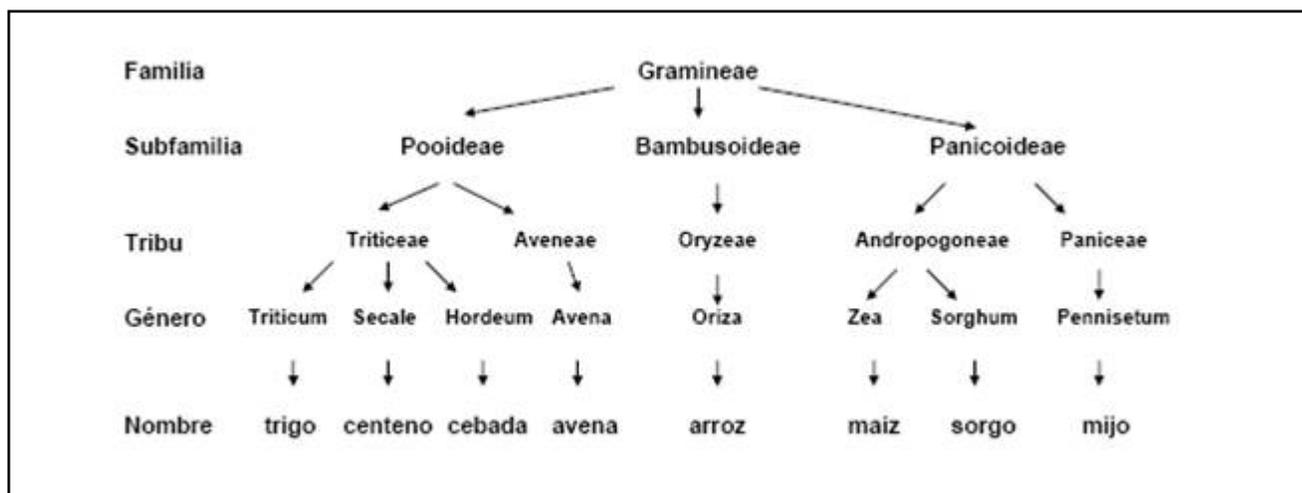


Figura 1. Esquema de la relación taxonómica entre distintas especies vegetales.

características diferentes (**Figura 1**) (Shewry PR and Halford NG., 2002).

La mayor parte del conocimiento actual de la patogenia de EC se obtuvo mediante el análisis de las características bioquímicas, inmunogénicas e inductoras de daño de las proteínas de trigo.

Las proteínas del endosperma del grano de trigo constituyen una mezcla compleja y fueron clasificadas originalmente por Osborne T.B. (1924) en cuatro fracciones de acuerdo a su solubilidad en: agua (*albúminas*), soluciones salinas (*globulinas*), solventes alcohólicos como el etanol 70% (*gliadinas*) y sólo solubles en condiciones más enérgicas tales como ácidos, bases, agentes reductores y detergentes, urea, etc (*gluteninas*).

Dado su alto contenido en los aminoácidos prolina y glutamina, las gliadinas y gluteninas reciben la denominación de prolaminas. Éstas son sintetizadas y depositadas en el endosperma del grano y constituyen

la fuente primaria de nitrógeno que se utilizará para la posterior síntesis de proteínas durante la germinación. Por su movilidad a pH ácido, las gliadinas han sido clasificadas en α -, β -, γ - y ω -gliadinas. En forma equivalente también se ha empleado esta clasificación para las proteínas de cebada y centeno (Shewry PR and Halford NG., 2002).

Las prolaminas presentan un elevado polimorfismo y alta homología debido a extensas regiones de secuencias repetitivas (de 4 a 9 aminoácidos de longitud que incluyen a prolina y glutamina). Las regiones repetitivas, así como secuencias de alta homología, generan una elevada reactividad cruzada entre las distintas prolaminas de un cereal y entre cereales. Estas características dificultan los estudios inmunológicos y la evaluación de su toxicidad.

Con el fin de conocer los mecanismos de patogenia de EC se usaron distintas fuentes de gliadinas. Las más empleadas han sido fraccio-

nes proteicas complejas de gliadinas comerciales, digestos enzimáticos obtenidos de gliadinas tratadas con enzimas digestivas como pepsina y tripsina y péptidos sintéticos.

Bases moleculares de la toxicidad de las prolaminas.

Como se ha mencionado, la EC es causada por una respuesta inmune inapropiada frente a péptidos derivados de la degradación proteolítica del gluten en el lumen intestinal. Tanto las vías efectoras de la inmunidad innata como adaptativa de la mucosa intestinal tienen un rol determinante en el establecimiento de la lesión. Los mecanismos desencadenados dependen del péptido en estudio ya que, claramente, péptidos como el 33 mer (p57-89) son inductores de una respuesta adaptativa mientras que el p31-43 produce una respuesta innata. En la **Figura 2** se muestran las secuencias de algunos péptidos que inducen daño a la mucosa intestinal (Qiao SW. et al, 2012).

A.										
p31-43 LGQQQPFPPQQPY										
33mer LQLQPFQPQLPYPQPQLPYPQPQLPYPQPQPF										
B.										
Restricción HLA	Proteína	1	2	3	4	5	6	7	8	9
DQ2	α -gliadina	P	F	P	Q	P	E	L	P	Y
	α -gliadina	P	Y	P	Q	P	E	L	P	Y
	α -gliadina	P	Q	P	E	L	P	Y	P	Q
	γ -gliadina	P	Q	Q	S	F	P	E	Q	Q
	γ -gliadina	I	Q	P	E	Q	P	A	Q	L
	γ -gliadina	P	Q	P	E	Q	E	F	P	Q
	glutenina	P	F	S	E	Q	E	Q	P	V
DQ8	α -gliadina	E	G	S	F	Q	P	S	Q	E
	γ -gliadina	E	Q	P	Q	Q	P	F	P	Q

Figura 2. Secuencias de péptidos inductores de respuesta inmune innata y adaptativa. **A.** Secuencias de los fragmentos p31-43 y 33mer. (código de aminoácidos de una letra). **B.** Secuencias de algunos péptidos derivados de gliadinas y gluteninas que se unen a HLA-DQ2 y DQ8. Se muestran las secuencias de los péptidos alineados (números de 1-9) de acuerdo a las posiciones de unión en el hueco de presentación de la molécula de HLA. En resaltado, se indica un cambio en aminoácido de Q glutamina por E ácido glutámico por actividad de TG2.

Prolaminas inductoras de respuesta innata.

La incubación de péptidos de gliadinas *ex vivo* con piezas de biopsias de intestino delgado produce una rápida respuesta evidenciada por el aumento de permeabilidad (disminución de la resistencia eléctrica) en el epitelio y liberación de mediadores proinflamatorios. La producción de mediadores inflamatorios inducidos por péptidos de gliadinas se evidenció también en sistemas *in vitro* donde se observó activación de la vía de señalización de NF κ B y la amplificación de otras vías de señalización, reclutamiento y activación celular.

El p31-43 ha sido el péptido más utilizado para modelar la participación de la respuesta innata en la patogenia de EC. Se ha observado que p31-43 modifica el tráfico de vesículas, permanece en el retículo endoplásmico sin degradación, produce estrés celular, aumento de intermediarios reactivos del oxígeno y apoptosis (Giovannini C., et al 2003; Barone MV., et al, 2007, 2011; Luciani A., et al, 2010). Este péptido induce también la expresión de IL-15 citoquina que, entre otras funciones, tiene dos efectos: es un fuerte inductor de la expresión de MICA en enterocitos y potencia la actividad citotóxica de los linfocitos intraepiteliales que expresan NKG2D. MICA es una molécula que se expresa en niveles muy bajos en tejidos normales pero que como consecuencia de diferentes situaciones patológicas se expresa en altos niveles en superficie celular. Allí funciona como un indicador de estrés dado que es reconocida por un receptor denominado NKG2D que se expresa en diferentes células citotóxicas (células NK, linfocitos T CD8 y linfocitos T $\gamma\delta$). En conjunto, estos eventos determinan un incremento de la apoptosis de los enterocitos, lo que contribuye a la

atrofia de vellosidades característica de los pacientes con enfermedad activa (Hue S. et al., 2004; Meresse et al., 2004).

Pasaje diferencial de péptidos de gliadinas.

Por su elevado contenido de prolinas, el gluten es muy resistente a la acción de las enzimas digestivas y, por lo tanto, en el lumen intestinal existen fragmentos residuales de gran tamaño. El caso más ilustrativo es el fragmento 33mer de α -gliadinas que permanece intacto aún después de una extensa incubación con enzimas gástricas, pancreáticas y del ribete en cepillo.

Estos fragmentos no digeridos tienen una acción directa sobre el epitelio provocando, por ejemplo, una disminución de la resistencia eléctrica y, por consiguiente, aumento de permeabilidad. En este mecanismo puede participar, entre otros mediadores, el IFN- γ , citoquina que afecta la integridad de la unión estrecha y contribuye a incrementar el pasaje paracelular (Schumann M et al., 2008). La traslocación transepitelial de péptidos de gliadinas se encuentra incrementada en la EC activa y se normaliza luego de la introducción de la dieta libre de gluten. Es llamativo que los péptidos de gliadinas son transportados en forma intacta en biopsias duodenales de pacientes celíacos mientras que sufren una fuerte degradación en piezas de individuos control. Este transporte eficiente depende del receptor CD71 que es sobreexpresado en la superficie apical de enterocitos en EC activa y actúa de mediador en el transporte de complejos IgA-gliadinas. Estos complejos son transportados intracelularmente en forma protegida de la degradación y descargados en la *lamina propria* contribuyendo a la respuesta inflamatoria en la mucosa (Matysiak-Budnik T. et al., 2003,

2008; Heyman M. et al., 2012).

Células dendríticas y macrófagos en mucosa intestinal en EC activa.

Como mencionamos, los péptidos derivados de gluten son resistentes a la degradación proteolítica en el lumen intestinal y muchos de ellos son transportados a través del epitelio en forma intacta. Una vez en la *lamina propria*, estos péptidos son procesados y presentados en moléculas de HLA clase II en células presentadoras de antígeno para inducir activación específica de linfocitos T CD4⁺. En este sentido, se ha demostrado que las células dendríticas HLA-DQ2⁺ aisladas de la *lamina propria* de biopsias de intestino delgado de pacientes celíacos presentan péptidos derivados de gluten en moléculas de HLA de clase II e inducen la proliferación antígeno-específica de clones T obtenidos de mucosa intestinal de pacientes celíacos. Tanto las células dendríticas como macrófagos pueden actuar como células presentadoras de antígeno DQ2⁺ en la *lamina propria* del intestino delgado (Raki M. et al., 2006). Hallazgos recientes muestran la participación de diferentes poblaciones de células dendríticas y macrófagos en EC activa que poseen diferentes actividades regulatorias y proinflamatorias (Beitnes A et al., 2011, 2012). Es posible que alguna de estas células colabore también en la amplificación de linfocitos T CD4⁺ del perfil Th17. En especial, se ha observado incremento de IL-21 a nivel de mensajero en mucosa intestinal celíaca. A su vez, linfocitos T específicos de péptidos de gluten aislados de mucosa intestinal en EC activa producen IL-21. Estas células pueden contribuir, conjuntamente con los linfocitos Th1, a la perpetuación y cronicidad de la lesión en la mucosa intestinal (Bodd M et al., 2010; Meresse B et al., 2012).

Rol de Transglutaminasa 2 en la patogenicia.

La transglutaminasa 2 (TG2) pertenece a una familia de enzimas que catalizan la formación de uniones covalentes entre grupos amino de lisina y amido de glutamina actividad que requiere la presencia del ión Ca^{2+} . Primero identificada como el principal autoantígeno detectado en la prueba de anticuerpos anti-endomisio y nuevo antígeno para serología por ELISA, TG2 adquirió luego mayor relevancia cuando se demostró su rol en la patogenicia de la EC. TG2 tiene un sitio activo que produce entrecruzamiento por uniones covalentes entre cadenas peptídicas pero también deamidación selectiva de glutaminas (Arentz-Hansen et al., 2000; Fesus L. and Piacentini M., 2002). La mayor parte de la actividad de deamidación producida por TG2 ocurre en el espacio extracelular. Sin embargo, en condiciones basales, en el espacio extracelular TG2 está inactiva y sólo bajo condiciones inflamatorias se produce un cambio hacia la forma enzimáticamente activa (Skovbjerg H. et al., 2008; Siegel M. et al., 2008). Este evento establece una vinculación directa entre el proceso inflamatorio y la generación de la respuesta T específica de péptidos de gluten.

Diferencias funcionales de la presentación de los péptidos de gliadinas en las moléculas de HLA-DQ2/DQ8.

Uno de los avances más importantes en la comprensión de los mecanismos de patogenicia de las enfermedades autoinmunes fue el aislamiento de linfocitos T de tejidos donde se desarrolla el proceso autorreactivo. Uno de los primeros casos fue el establecimiento de líneas T de mucosa intestinal de pacientes celíacos (Lundin KE., et al. 1993). La caracterización de la reactividad

de estos linfocitos T restringidos a los alelos de susceptibilidad permitió la identificación de los epitopes T en las secuencias de α -gliadinas, γ -gliadinas, ω -gliadinas y gluteninas (**Figura 2**) (Molberg O et al., 1997; van de Wal Y. et al 1998). Las moléculas HLA-DQ2 y DQ8 tienen preferencia por aminoácidos cargados negativamente en ciertas posiciones de anclaje. Estas cargas son generadas por deamidación específica (conversión de residuos de glutaminas en ácido glutámico) por actividad de la enzima TG2 (Shan L. et al, 2002).

Debido a su especial capacidad de acomodar péptidos ricos en prolina y su preferencia por residuos con carga negativa (glutamato) como residuo de posición de anclaje, la molécula HLA-DQ2 es excepcionalmente adecuada para unir péptidos con alto contenido de prolina y glutamina producidos por digestión luminal y deamidación por TG2. Aunque HLA-DQ8 comparte algunas de estas propiedades, presenta diferentes características de unión, con menores constantes de asociación y confiere un menor riesgo relativo.

Las características de unión de los péptidos derivados de gluten a las moléculas HLA-DQ2 o DQ8 determinan una presentación antigénica eficiente que permite la formación de una sinapsis inmunológica entre las células presentadoras de antígeno y los linfocitos T y, consecuentemente, la activación de éstos. En el caso particular de la EC, la presentación de péptidos derivados de gluten por células dendríticas determina la activación y diferenciación de linfocitos T CD4 hacia un perfil Th1, proceso que ocurre en los ganglios mesentéricos y se acompaña de la inducción de marcadores de direccionamiento ("homing") a intestinal. Luego de alcanzar este si-

tio, los linfocitos Th1 (como células efectoras productoras de citoquinas proinflamatorias) recirculan y se localizan en *lamina propria* del intestino delgado. Ante la ingesta de proteínas de trigo, estos linfocitos Th1 serán activados específicamente por células presentadoras de antígeno locales (células dendríticas y macrófagos) y producirán grandes cantidades de diversas citoquinas inflamatorias entre la que se destaca el interferón (IFN)- γ . En su conjunto, estos eventos llevan al daño de la mucosa intestinal debido a la magnitud de dicha respuesta inflamatoria.

■ HLA COMO FACTOR DE SUSCEPTIBILIDAD

En la población europea, casi el 95% de los pacientes celíacos expresan HLA-DQ2, molécula que puede ser generada a partir de dos conformaciones cromosómicas, ya sea en cis en el haplotipo DR3/DQ2 o bien en trans en individuos DR5/DR7 (**Figura 3**). Los estudios genéticos muestran que la mayoría de los pacientes celíacos son HLA-DQ2: DQA1*0501, DQB1*0201 (variante codificada como DQ2.5) o DQ8: DQA1*03, DQB1*0302. Entre los pacientes que no expresan esos alelos se encuentran algunos que expresan DQA1*0201, DQB1*0202 (variante codificada como DQ2.2). Las tres moléculas de clase II pueden presentar péptidos de gliadinas en ensayos de estimulación específica de linfocitos T. Entre las variantes de DQ2 se observa que DQ2.5 está fuertemente asociada a EC y también a otras enfermedades autoinmunes. En cambio DQ2.2 tiene un menor riesgo asociado a EC y no se ha descrito asociación con otras patologías autoinmunes (Jabri B. and Sollid L., 2009).

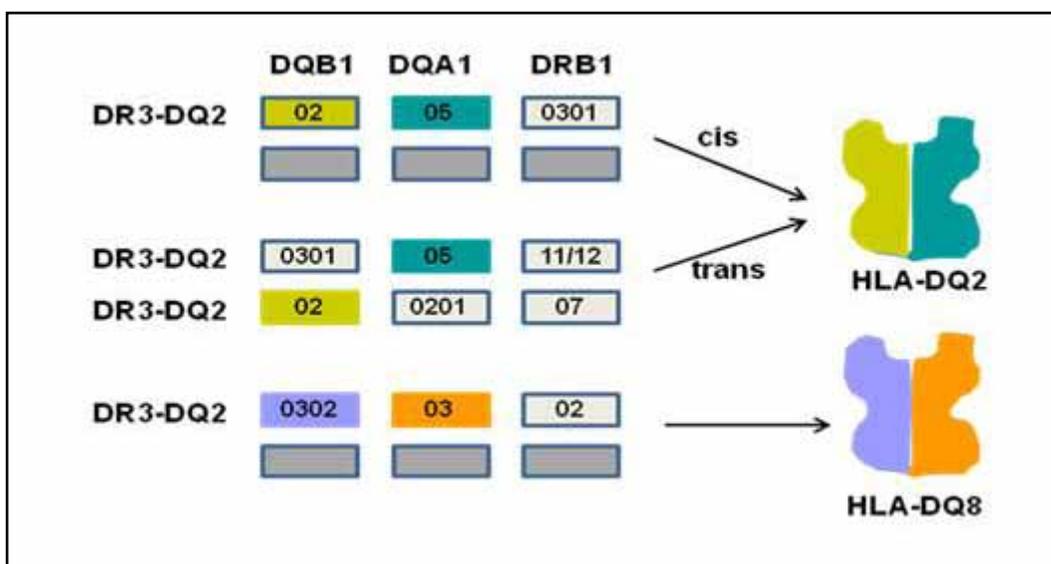


Figura 3. Conformación de las moléculas de susceptibilidad HLA-DQ2/DQ8 de acuerdo a la constitución haplotípica.

■ **GENES ASOCIADOS A EC**

La EC tiene un origen multigénico. Casi la totalidad de la población celíaca expresa uno u otro de los alelos HLA-DQ2/DQ8 aunque estos alelos contribuyen sólo en 35% al riesgo genético de susceptibilidad. Por ello, deben existir otros factores genéticos implicados. Estudios de asociación genética (GWAS; Genome Wide Association Studies) permitieron describir 26 regiones genómicas con asociación a EC (Dubois et al., 2010; Trynka G., et al 2011; Abadie V et al., 2011).

En los casos donde se pudieron definir genes con funciones conocidas se encontraron genes asociados con procesos inflamatorios e inducción de apoptosis, entre otros (Mon-suur AJ., et al. 2005; Van Heel D., 2007; Castellanos-Rubio A. et al., 2009). Estos genes pueden participar en innumerables procesos biológicos en la mucosa intestinal (**Tabla 3**).

La contribución individual de cada gen es muy baja y la complejidad de la patogenia hace difícil establecer el impacto de cada uno. Sin embargo, aun realizando un complejo análisis genético es claro que

otros factores externos, entre los que se han considerado a las infecciones entéricas, serían determinantes en el desencadenamiento de la enfermedad (Abadie V. et al. 2011; Meresse B et al., 2012).

■ **MODELOS ANIMALES EN EL ESTUDIO DE EC**

En muchas enfermedades, en particular en las que el sistema inmune está involucrado, el empleo de modelos animales ha permitido una sustancial contribución al conocimiento de los mecanismos de patogenia. Para el estudio de EC se han

Tabla 3. Genes (no HLA) asociados a Enfermedad Celíaca y su posible rol funcional en la patogenia	
Vías involucradas	Genes asociados
Desarrollo de linfocitos T (maduración/diferenciación)	THEMIS, RUNX3, ETS1, TNFRSF14
Maduración y diferenciación de linfocitos Th1	IL-2, IL-21, IL-12A, IL-23R, IL-18R1/IL-18RAP
Vías de señalización en células del sistema inmune	CTLA4, SH2B3, ICOSLG, RGS1, superfamilia TNFRSF4/9/14, superfamilia de quimoquinas y receptores (CCR), SOCS1
Inmunidad innata: Respuesta a la infección (virus)	TLR7, TLR8, IRF4, BACH2
Inmunidad innata: señalización de la vía NFκB	REL, TNFAIP3, TNFRSF9

propuesto complejos modelos experimentales que se basan en el empleo de animales modificados genéticamente. Sin embargo, en ningún caso se pudo reproducir completamente la patología observada en intestino delgado humano (Marietta EV et al., 2012). Por ejemplo, en animales transgénicos que expresan las moléculas humanas CD4 y HLA-DQ2, luego de ser desafiados con gliadinas, se encontraron linfocitos T CD4⁺ específicos en *lamina propria* pero no se observó enteropatía (deKauwe A et al., 2009). En un sistema más complejo, De Paolo R. et al. (2011) mostraron que la administración de ácido retinoico en animales transgénicos que sobreexpresan IL-15 en mucosa intestinal produce una severa desregulación con fuerte producción de IFN γ y aumento del número de linfocitos intraepiteliales. En este modelo, las citoquinas IL-12 e IL-23 serían determinantes en el mecanismo desencadenado. Sin embargo, no se observaron signos claros de alteración histológica. Estos resultados evidencian la complejidad de los componentes que participan en la mucosa intestinal humana para el desarrollo de EC.

■ SENSIBILIDAD AL GLUTEN

Hasta ahora hemos descripto a EC como una patología producida como respuesta inmune al gluten en individuos genéticamente susceptibles. Sin embargo, en los últimos años se ha observado una condición muy frecuente donde los pacientes presentan signos variados y difusos de alteración gastrointestinal (como dolor abdominal, motilidad alterada, incremento de permeabilidad), sin serología de EC ni alteración histológica en la mucosa intestinal. Los pacientes responden favorablemente a la dieta de exclusión de gluten. Esta condición, denominada Sensibilidad al gluten no-celiaca, genera un desafío en el descubrimiento de

los factores que la desencadenan y en su diagnóstico definitivo (Troncone R and Jabri B., 2011).

■ CONCLUSIONES

La enfermedad celíaca es una enteropatía crónica donde participan complejos mecanismos de la respuesta inmune innata y adaptativa. Aunque es una enfermedad que tiene elevada prevalencia, la presentación clínica variable y la falta de búsqueda adecuada, generan un alto nivel de subdiagnóstico. En este sentido, los avances en el desarrollo de nuevos ensayos de serología, con mayor sensibilidad y especificidad, han permitido revelar la verdadera prevalencia de la enfermedad (con un aumento relevante en el número de casos con clínica atípica o formas asintomáticas). El diagnóstico temprano y el seguimiento de una dieta estricta libre de gluten normalizan la fisiología de la mucosa intestinal y reduce significativamente las complicaciones observadas en aquellos pacientes sin tratamiento.

Las investigaciones en curso se orientan a definir otros factores ambientales (como lactancia y edad de introducción del gluten, infecciones, cambios en la microbiota, etc.) que podrían ser determinantes en el inicio de la patología. A su vez, nuevos estudios buscan identificar factores genéticos asociados, y cómo éstos pueden condicionar el inicio o la forma de la presentación clínica. Aunque el conocimiento de la patogenia es muy profundo, existen aspectos críticos que aun no se han esclarecido completamente. No obstante, la información acumulada seguramente será de utilidad para proponer estrategias terapéuticas alternativas.

■ REFERENCIAS

- Abadie V, Sollid LM, Barreiro LB,

Jabri B. (2011). Integration of Genetic and Immunological Insights into a Model of Celiac Disease Pathogenesis. *Annu. Rev. Immunol.* 29, 493–525.

- Arentz-Hansen H, Korner R., Molberg O., Quarsten H., Vader W., Kooy. Y., Lundin K.E.A., Koning F., Roepstorff P., Sollid L. M and McAdam S. (2000) The intestinal T cell response to alfa gliadin in adult celiac disease is focused on a single deamidated glutamine targeted by tissue transglutaminase. *J. Exp. Med.* 191, 4: 603-612.
- Arranz E, Bode J, Kingstone K, Ferguson A. (1994). Gamma/delta T cell receptor expression by intraepithelial lymphocytes in relation to other indices of potential coeliac disease. *Gut.* 35. 476-82.
- Barone MV, Gimigliano A, Castoria G, Paoletta G, Maurano F, Papparo F, Maglio M, Mineo A, Miele E, Nanayakkara M, Troncone R, Auricchio S. (2007). Growth factor-like activity of gliadin, an alimentary protein: implications for coeliac disease. *Gut.* 56, 480-488.
- Barone MV, Zanzi D, Maglio M, Nanayakkara M, Santagata S, Lania G, Miele E, Ribocco MT, Maurano F, Auricchio R, Gianfrani C, Ferrini S, Troncone R, Auricchio S. (2011) Gliadin-mediated proliferation and innate immune activation in celiac disease are due to alterations in vesicular trafficking. *PLoS One.* 6, e17039.
- Beitnes AC, Ráki M, Lundin KE, Jahnsen J, Sollid LM, Jahnsen FL. (2011). Density of CD163⁺ CD11c⁺ dendritic cells increases and CD103⁺ dendritic cells decreases in the coeliac lesion. *Scand J Immunol.* 74, 186-94.
- Beitnes AC, Ráki M, Brottveit M, Lundin KE, Jahnsen FL, Sollid LM. (2012). Rapid accumulation of CD14⁺CD11c⁺ dendritic cells in gut mucosa of celiac disease

- after in vivo gluten challenge. *PLoS One*. 7, e33556.
- Bodd M, Ráki M, Tollefsen S, Fallang LE, Bergseng E, Lundin KE, Sollid LM. (2010). HLA-DQ2-restricted gluten-reactive T cells produce IL-21 but not IL-17 or IL-22. *Mucosal Immunol*. 3, 594-601.
 - Brocchi E, Tomassetti P, Misitano B, Epifanio G, Corinaldesi R, Bonvicini F, Gasbarrini G, Corazza G. (2002). Endoscopic markers in adult coeliac disease. *Dig Liver Dis*. 34, 177-82.
 - Castellanos-Rubio A, Santin I, Martín-Pagola A, Irastorza I, Castaño L, Vitoria JC, Bilbao JR. (2010). Long-term and acute effects of gliadin on small intestine of patients on potentially pathogenic networks in celiac disease. *Autoimmunity*. 43, 131-9.
 - Catassi C, Kryszak D, Louis-Jacques O, Duerksen DR, Hill I, Crowe SE, Brown AR, Procaccini NJ, Wonderly BA, Hartley P, Moreci J, Bennett N, Horvath K, Burk M, Fasano A. (2007). Detection of celiac disease in primary care: a multicenter case-finding study in North America. *Am. J. Gastroenterol*. 102, 1454-60.
 - de Kauwe AL, Chen Z, Anderson RP, Keech CL, Price JD, Wijburg O, Jackson DC, Ladhams J, Allison J, McCluskey J. (2009). Resistance to celiac disease in humanized HLA-DR3-DQ2-transgenic mice expressing specific anti-gliadin CD4+ T cells. *J Immunol*. 182, 7440-50.
 - DePaolo RW, Abadie V, Tang F, Fehlner-Peach H, Hall JA, Wang W, Marietta EV, Kasarda DD, Waldmann TA, Murray JA, Semrad C, Kupfer SS, Belkaid Y, Guandalini S, Jabri B. (2011). Co-adjunct effects of retinoic acid and IL-15 induce inflammatory immunity to dietary antigens. *Nature*. 471, 220-4.
 - Dubois PC, et al. (2010). Multiple common variants for celiac disease influencing immune gene expression. *Nat Genet*. 42, 295-302.
 - Ferguson A, Arranz E, O'Mahony S. (1993) Clinical y pathological spectrum of celiac disease. Active, silent, latent, potential. *Gut*. 34, 150-1.
 - Fesus L, Piacentini M. (2002). Transglutaminase 2: an enigmatic enzyme with diverse functions. *Trends Biochem Sci*. 27, 534-9.
 - Gomez JC, Selvaggio GS, Viola M, Pizarro B, la Motta G, de Barrio S, Castelletto R, Echeverría R, Sugai E, Vazquez H, Mauriño E, Bai JC. (2001). Prevalence of celiac disease in Argentina: screening of an adult population in the La Plata area. *Am J Gastroenterol*. 96, 2700-4.
 - Gomez JC, Selvaggio G, Pizarro B, Viola MJ, La Motta G, Smecuol E, Castelletto R, Echeverria R, Vazquez H, Mazure R, Crivelli A, Sugai E, Mauriño E, Bai JC. (2002). Value of a screening algorithm for celiac disease using tissue transglutaminase antibodies as first level in a population-based study. *Am J Gastroenterol*. 97, 2785-90.
 - Giovannini C, Matarrese P, Scanzocchio B, Varí R, D'Archivio M, Straface E, Masella R, Malorni W, De Vincenzi M. (2003). Wheat gliadin induces apoptosis of intestinal cells via an autocrine mechanism involving Fas-Fas ligand pathway. *FEBS Lett*. 540, 117-24.
 - Green P.H., Cellier C. (2007). Celiac disease. *N Engl J Med*. 357, 1731-43.
 - Heyman M, Abed J, Lebreton C, Cerf-Bensussan N. (2012). Intestinal permeability in coeliac disease: insight into mechanisms and relevance to pathogenesis. *Gut*. 61, 1355-64.
 - Hüe S, Mention JJ, Monteiro RC, Zhang S, Cellier C, Schmitz J, Verkarre V, Fodil N, Bahram S, Cerf-Bensussan N, Caillat-Zucman S. (2004). A direct role for NKG2D/MICA interaction in villous atrophy during celiac disease. *Immunity*. 21, 367-77.
 - Jabri B and Sollid LM. (2009). Tissue-mediated control of immunopathology in coeliac disease. *Nat Rev Immunol*. 9, 858-70.
 - Lewis NR, Holmes G. (2010). Risk of morbidity in contemporary celiac disease. *Exp Rev gastroenterol Hepatol*. 4, 767-80.
 - Luciani A, Vilella VR, Vasaturo A, Giardino I, Pettoello-Mantovani M, Guido S, Cexus ON, Peake N, Londei M, Quarantino S, Maiuri L. (2010). Lysosomal accumulation of gliadin p31-43 peptide induces oxidative stress and tissue transglutaminase-mediated PPARgamma downregulation in intestinal epithelial cells and coeliac mucosa. *Gut*. 59, 311-9.
 - Lundin KE, Scott H, Hansen T, Paulsen G, Halstensen TS, Fausa O, Thorsby E, Sollid LM. (1993). Gliadin-specific, HLA-DQ (a1*0501, b1*0201) restricted T cells isolated from the small intestinal mucosa of celiac disease patients. *J. Exp. Med*. 178, 187-96.
 - Marietta EV, Murray JA. (2012). Animal models to study gluten sensitivity. *Semin Immunopathol*. 34, 497-511.
 - Marsh MN. (1992). Gluten, major histocompatibility complex, and the small intestine. A molecular and immunobiologic approach to the spectrum of gluten sensitivity ("celiac sprue"). *Gastroenterology*. 102, 220-354.
 - Matysiak-Budnik T, Candalh C, Dugave C, Namane A, Cellier C, Cerf-Bensussan N, Heyman M. (2003). Alterations of the intestinal transport and processing of gliadin peptides in celiac disease. *Gastroenterology*. 125, 696-707.
 - Matysiak-Budnik T, Moura IC, Ar-

- cos-Fajardo M, Lebreton C, Ménard S, Candalh C, Ben-Khalifa K, Dugave C, Tamouza H, van Niel G, Bouhnik Y, Lamarque D, Chaussade S, Malamut G, Cellier C, Cerf-Bensussan N, Monteiro RC, Heyman M. (2008). Secretory IgA mediates retrotranscytosis of intact gliadin peptides via the transferrin receptor in celiac disease. *J Exp Med.* 205, 143-54.
- Meresse B, Chen Z, Ciszewski C, Tretiakova M, Bhagat G, Krausz TN, Raulet DH, Lanier LL, Groh V, Spies T, Ebert EC, Green PH, Jabri B. (2004). Coordinated induction by IL15 of a TCR-independent NKG2D signaling pathway converts CTL into lymphokine-activated killer cells in celiac disease. *Immunity.* 21, 357-66.
 - Meresse B, Malamut G, Cerf-Bensussan N. (2012). Celiac disease: an immunological jigsaw. *Immunity.* 36, 907-19.
 - Molberg O, Kett K, Scott H, Thorsby E, Sollid LM, Lundin KE. (1997). Gliadin-specific, HLA-DQ2-restricted T cells are commonly found in small intestinal biopsies from coeliac disease patients, but not from controls. *Scand J Immunol.* 46, 103-108.
 - Monsuur AJ., et al. (2005). Myosin IXB variant increases the risk of celiac disease and points toward a primary intestinal barrier defect. *Nat Genet.* 37, 1341-44.
 - Oberhuber G, Granditsch G, Vogelsang H. (199). The histopathology of coeliac disease: time for a standardized report scheme for pathologists. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 11, 1185-1194.
 - Piccini B, Vascotto M, Serracca L, Luddi A, Margollicci MA, Balesstri P, Vindigni C, Bassotti G, Villanacci V. (2012). HLA-DQ typing in the diagnostic algorithm of celiac disease. *Rev. Esp. Enferm. Dig. (Madrid).* 104, 248-254.
 - Qiao SW, Iversen R, Ráki M, Sollid LM. (2012). The adaptive immune response in celiac disease. *Semin Immunopathol.* 34, 523-40.
 - Ráki M, Tollefsen S, Molberg Ø, Lundin KE, Sollid LM, Jahnsen FL. (2006). A unique dendritic cell subset accumulates in the celiac lesion and efficiently activates gluten-reactive T cells. *Gastroenterology.* 131, 428-38.
 - Rampertab SD, Pooran N, Brar P, Singh P, Green PH. (2006). Trends in the presentation of celiac disease. *Am. J. Med.* 119, 335.
 - Ravelli AM, Tobanelli P, Minelli L, Villanacci V, Cestari R. (2001). Endoscopic features of celiac disease in children. *Gastrointest Endosc.* 54, 736-42.
 - Schumann M, Richter JF, Wedell I, Moos V, Zimmermann-Kordmann M, Schneider T, Daum S, Zeitz M, Fromm M, Schulzke JD. (2008). Mechanisms of epithelial translocation of the alpha(2)-gliadin-33mer in coeliac sprue. *Gut.* 57, 747-54.
 - Shan L, Molberg Ø, Parrot I, Hausch F, Filiz F, Gray GM, Sollid LM, Khosla C. (2002). Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. *Science.* 297, 2275-9.
 - Shewry P.R. and Halford N.G. (2002). Cereal seed storage proteins: Structures, properties and role in grain utilization. *J. Exp. Botany.* 53, 947-958
 - Siegel M, Strnad P, Watts RE, Choi K, Jabri B, Omary MB, Khosla C. (2008). Extracellular transglutaminase 2 is catalytically inactive, but is transiently activated upon tissue injury. *PLoS One.* 3, e1861.
 - Skovbjerg H, Anthonsen D, Knudsen E, Sjöström H. (2008). Deamidation of gliadin peptides in *lamina propria*: implications for celiac disease. *Dig Dis Sci.* 53, 2917-24.
 - Sollid LM and Lie BA. (2005). Celiac disease genetics: current concepts and practical applications. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 3, 843-851.
 - Troncone R, Jabri B. (2011). Coeliac disease and gluten sensitivity. *J Intern Med.* 269, 582-90.
 - Trynka G., et al. (2011). Dense genotyping identifies and localizes multiple common and rare variant association signals in celiac disease. *Nat Genet.* 43, 1193-201.
 - van de Wal I., Kooy. Y., van Veelen P., Pena S., Mearin L., Papadopoulos G. and Koning F. (1998). Selective deamidation by tissue transglutaminase strongly enhances gliadin-specific T cell reactivity. *J. Immunol.* 161, 1585-1588.
 - van Heel DA. et al. (2007). A genome-wide association study for celiac disease identifies risk variants in the region harboring IL2 and IL21. *Nat Genet.* 39, 827-9.
 - Vermeersch P, Geboes K, Mariën G, Hoffman I, Hiele M, Bossuyt X. (2012). Serological diagnosis of celiac disease: comparative analysis of different strategies. *Clin Chim Acta.* 413, 1761-7.



**34 CENTROS DE INVESTIGACIÓN PROPIOS, ASOCIADOS,
VINCULADOS O EN RED**

INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA

- ↘ **CARRERA DEL INVESTIGADOR CIENTÍFICO Y TECNOLÓGICO**
- ↘ **CARRERA DEL PERSONAL DE APOYO A LA INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO**
- ↘ **PROGRAMA DE BECAS**
 - Becas de entrenamiento para alumnos universitarios
 - Becas de estudio
 - Becas de perfeccionamiento
- ↘ **SUBSIDIOS**
 - Para la Realización de Reuniones Científicas y Tecnológicas y Asistencia a Reuniones
 - Para Publicaciones Científicas y Tecnológicas
 - Para Proyectos de Investigación de Interés Provincial

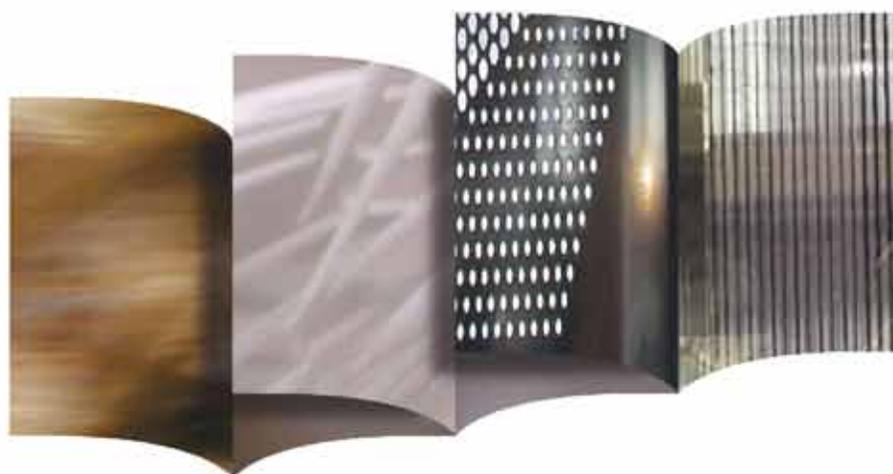
**INNOVACIÓN, TRANSFERENCIA TECNOLÓGICA Y CULTURA
EMPREDEDORA**

- ↘ **PROGRAMA DE MODERNIZACIÓN TECNOLÓGICA**
- ↘ **PROGRAMA EMPRECIC**
- ↘ **CRÉDITO FISCAL**
- ↘ **PROGRAMA DE FORMACIÓN DE FORMADORES EN
EMPREDEDORISMO**

Ciencia Tecnología Innovación

 *comisioendeinvestigaciones.
cientificas*

www.cic.gba.gov.ar



Desarrollo y gestión de proyectos científicos y tecnológicos innovadores

FUNINTEC es una organización sin fines de lucro creada por la Universidad de San Martín cuyo objetivo es promover y alentar la investigación, el desarrollo tecnológico y la transferencia de conocimientos a los sectores público y privado, sus empresas y en particular a las PyMES.

Dentro de los alcances previstos por la Ley de Innovación Tecnológica, funciona como vínculo entre el sistema científico tecnológico y el sector productivo.

CONTACTO:
www.funintec.org.ar

Fundación
Innovación
y Tecnología

FUNINTEC

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN



SISTEMA INMUNE Y DAÑO POR INFLAMACIÓN

Palabras clave: inflamación proteasas inhibidores de serino-proteasas.
Key words: inflammation proteases serine protease inhibitors.

La inflamación es una de las consecuencias más relevantes de la respuesta del sistema inmune del organismo en la que se ponen en juego el reconocimiento y la señalización entre moléculas y células que participan en la inmunidad innata y adaptativa. Su resolución es crucial para volver a la homeostasia del sistema. Cuando la inflamación no puede ser regulada se desencadenan procesos patológicos que llevan a una gran destrucción tisular. En el presente trabajo se describe como se reconoce la noxa y como se desencadena el proceso inflamatorio, enumerando los mecanismos que participan en el daño tisular, poniendo especial énfasis en la acción de serino-proteasas. Se explican también los mecanismos que dispone el organismo que le permiten al individuo controlar la acción dañina de las proteasas. Finalmente, se describen funciones microbicidas redundantes de proteasas y anti-proteasas y, a la vez, efectos inmunomoduladores sobre la inmunidad innata y adaptativa. Conocer los diferentes componentes de la respuesta inflamatoria y los mecanismos de control del daño tisular nos permitirá desarrollar herramientas terapéuticas más eficientes y con menores efectos adversos

■ **Eduardo Chuluyán*,
Mercedes L. Sánchez,
Diego Guerrieri,
Nella Ambrosi.**

Laboratorio de Inmunomoduladores, Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos, CONICET- Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

*echuluyan@gmail.com

Inflammation is one of the most relevant consequences of the immune system's response during which the recognition and signalling among molecules and cells that participate in the innate and adaptive immunity play an important role. Its resolution is crucial in order to return to the homeostasis of the system. When inflammation cannot be regulated, pathological processes are triggered that lead to large tissue destruction. In this review, we described the noxa and its recognition by the immune system. Also, we analyzed the inflammatory process and the mechanisms involved in tissue damage with particular emphasis on the action of serine proteases. We also explain the mechanisms available to the body that allows the individual to control the harmful action of proteases. Finally, we describe, redundant microbicide functions of anti-proteases and proteases, and simultaneously, immunomodulatory effects on innate and adaptive immunity. Knowing the different components of the inflammatory response and control mechanisms of tissue damage will allow us to develop more efficient therapeutic tools with fewer adverse effects.

■ A) INFLAMACIÓN: RECONOCIMIENTO DEL DAÑO

En el siglo I A.C. el médico romano Celsius caracteriza al proceso inflamatorio con su famosa tétrada constituida por calor, rubor, tumor (edema) y dolor. Más tarde, Galeno habría de agregar a estos signos, la "functio laesa", es decir un déficit funcional asociado al proceso inflamatorio. Todos los signos inflamatorios, en principio inespecíficos, se deben a una respuesta coordinada que tiene lugar en nuestro organismo frente al reconocimiento de una noxa o lesión tisular. Luego del reconocimiento de ese daño se

produce la liberación de sustancias endógenas que provocan la extravasación temprana de líquidos y más tardía de leucocitos.

Las reacciones inflamatorias no se limitan a un tejido u órgano pudiendo aparecer en cualquier sitio donde se encuentre la noxa. En primer lugar para que esta noxa pueda desencadenar el proceso se debe reconocer al agente agresor. La naturaleza del agente agresor puede ser muy variable: agentes microbianos vivos o muertos, partículas inertes, células muertas o incluso la presencia de daño tisular aún en ausencia

de gérmenes. De tal manera que la noxa puede ser un agente agresor de naturaleza biológica, química, física o incluso mecánica. La célula al ser dañada reacciona frente a la agresión liberando proteínas constitutivas intracelulares como por ejemplo proteínas de estrés térmico (*heat shock proteins*) y HMGB-1 (*high mobility group box 1*) (Bianchi 2007).

Por otro lado, el organismo dispone de diferentes tipos de receptores capaces de identificar al agente agresor y responder provocando el fenómeno inflamatorio.

Los receptores capaces de reconocer una noxa son denominados receptores de reconocimiento de patrones (RRP) (Newton and Dixit 2012). A su vez, estos RRP pueden

ser clasificados como RRP asociados a patógenos o asociados a daño. En el primer caso, reconocen patrones moleculares asociados al patógeno (PAMPs) en tanto que en el segundo

caso reconocen patrones moleculares asociados a daño (DAMPs). Los PAMPs son estructuras moleculares evolutivamente conservadas presentes en los microorganismos que

TABLA 1. Receptores y Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PAMPs) y a Daño (DAMPs)

RECEPTORES	PAMPs	DAMPs
TLR4	Lipopolisacáridos Manan Glucuroxylomanan Glicoinositolfosfolípidos	HSP-60, HSP-70 Hialuronanos, Biglicanos Fibrinógeno, Heparán sulfato Dominio A de fibronectina HMGB1 Proteína S100/calgranulinas Cristales de ácido úrico Defensinas Lactoferrina
TLR2/6	Diacil-lipopéptidos Ac. Lipoteicoico Zimosán	
TLR2/1	Triacil-lipopéptido	
TLR2	Peptidoglicano Porinas Lipoarabinomananos Fosfolipomanan Glucuroxilomananos tGPI-mucina Hemaglutinina	Hialuronanos Biglicanos Versican HMGB1 HSP Cristales de ácido úrico
TLR3	ARNdc (ARN de doble cadena)	
TLR5	Flagelina	
TLR7/8	ARNsc	Cathelicidinas
TLR9	ADN CpG ADN viral	ADN bajo la forma de complejo inmune HMGB1 Cathelicidinas ADN mitocondrial
NLRP3		Hialuronanos, Biglicanos Proteína β -amiloide
CD44		HMGB1
RAGE		HMGB1 Proteína S100/calgranulinas Proteína β -amiloide
CD91		HSPs
CD40		HSPs
NLRC	Peptidoglicanos	
NLRP	Bacterias , virus, hongos	ATP Proteína β -amiloide Sílica, Amianto Radiación UV, toxinas Agentes inductores de eflujo de potasio
CLR	Manosa, mucosa y β -glucano	
RLR	ARN viral bicatenario	
R. Scavenger	Componentes microbianos (glicoproteínas, lipoproteínas, lípidos)	LDL modificado Ligandos polianiónicos Células apoptóticas

cumplen una función esencial para la vida del mismo. Son ejemplos de PAMPs, el ADN bacteriano, los componentes esenciales de la pared bacteriana, el ARN viral, entre otros. En tanto, los DAMPs son moléculas provenientes de la degradación de la matriz extracelular o moléculas intracelulares propias liberadas por células activadas o necróticas (Bianchi 2007).

Los RRP constituyen un número importante y variado de moléculas ubicados en la superficie o en el interior celular que incluso pueden ser solubles. Como ejemplos de RRP de membrana encontramos receptores de tipo Toll o TLR, receptores de tipo NOD o NLR, receptores de tipo lectinas, receptores scavenger y receptores de tipo RIG-I. Sin embargo, también es posible identificar la noxa cuando la misma es opsonizada por anticuerpos o por complemento. En estos casos, el reconocimiento ocurre a través de receptores para el fragmento Fc de la inmunoglobulina y los receptores para fragmentos del complemento. En ambos casos, una vez reconocida la partícula opsonizada por las moléculas de inmunoglobulinas o por los fragmentos del complemento, se produce la fagocitosis de las partículas (Newton and Dixit 2012).

Algunos de los RRP secretorios son las ficolinas, las pentraxinas y las colectinas (Du Clos and Mold 2011). Estos receptores tienen la particularidad de unirse a los PAMPs facilitando su depuración por las células del sistema inmune. Los demás RRP, presentes en la superficie celular o en el interior de las células, actuarán activando vías de señalización intracelular que llevarán a la expresión de citocinas, quimiocinas y moléculas de adhesión que participarán en el proceso inflamatorio. Se tiene que tener en cuenta que, a diferencia de los receptores antigénicos de

los linfocitos T y B, los RRP son no clonales y están codificados en la línea germinal (es decir, no dependen de un rearrreglo de genes que deben ensamblar un gen funcional).

Cada célula de nuestro organismo, y en particular las células de la respuesta inmune innata como neutrófilos y macrófagos, dispondrán de una combinación de RRP que les permitirá reconocer y responder frente a la noxa produciendo factores (citocinas y quimiocinas) que amplificarán la respuesta inflamatoria inicial.

Siendo tan variado el agente agresor, y habiendo diferentes maneras de reconocer al mismo, resulta claro que sería imposible abarcar en este trabajo la descripción detallada de la manera en que se induce la respuesta inflamatoria por cada uno de los PAMPs y DAMPs. Es por eso, que tomaremos sólo un ejemplo de PAMP y DAMP. Para el primero, describiremos el reconocimiento del lipopolisacárido (LPS) un componente de la pared de las bacterias Gram negativas. El LPS soluble es una partícula inerte que *per se* es incapaz de liberar citocinas. Para que el LPS pueda inducir la liberación de citocinas se requiere de una proteína de unión al LPS (denominada LBP), el receptor de membrana CD14 y TLR4. La LBP que es producida por el hígado y está presente en el plasma se unirá al LPS. La molécula de CD14 presente sobre la superficie de monocitos/macrófagos permitirá el anclaje del LPS a la superficie celular. Una vez en la superficie celular el LPS es reconocido por TLR4 que, a través de una molécula accesoria, inicia una cascada de señalización que lleva a la producción de citocinas pro-inflamatorias. Para el caso de TLR4, la cascada de señalización puede optar por una vía de señalización dependiente o independiente de MyD88 (una proteína adaptadora

intracelular) siendo la primera una respuesta rápida mientras que la independiente es una respuesta lenta. Clásicamente, se piensa que los receptores de TLR sólo se expresan en células del sistema inmune innato. Sin embargo, se ha descrito expresión de TLR4 y TLR2 en ciertas células epiteliales como por ejemplo las células tubulares renales y también en los podocitos. Existen en la actualidad 13 TLR que difieren en su localización subcelular y en el reconocimiento de sus ligandos (Song and Lee 2012).

Como ejemplo de DAMP, mencionaremos a HMGB1. Esta proteína, es miembro de una superfamilia que agrupa proteínas nucleares que presentan una alta movilidad electroforética. Esta molécula, que en realidad incluye a tres familias de proteínas, comparte un dominio "box" que media el acoplamiento de la proteína al ADN y actúa como un elemento estabilizador del mismo. Luego de una agresión celular, HMGB1 se libera al medio extracelular y actúa sobre receptores tales como RAGE (*Receptor for Advanced Glycation Endproducts*) pertenecientes a la superfamilia de inmunoglobulinas potenciando el proceso inflamatorio (Sims, Rowe et al. 2010).

Independientemente de cómo se haya reconocido el agente agresor, el resultado final es la generación de mediadores inflamatorios que llevarán al reclutamiento de leucocitos. Ese reclutamiento se verá favorecido por la producción de factores quimioattractantes y por la expresión de moléculas de adhesión. Los mediadores inflamatorios serán producidos inicial y principalmente por los macrófagos tisulares y mastocitos perivasculares. Luego, las células reclutadas aportarán un mayor número de mediadores inflamatorios que terminarán por amplificar la

respuesta inflamatoria. Entre los mediadores inflamatorios iniciales se pueden mencionar a los neuropéptidos liberados por las terminaciones nerviosas libres (sustancia P y taquíninas) que actuarán sobre receptores de la membrana de los mastocitos, los cuales liberan serino-proteasas presentes en sus gránulos (triptasas) que al unirse a los receptores activados por proteasas (PAR) aumentarán la producción de los neuropéptidos tales como el péptido relacionado al gen de la calcitonina (*Calcitonin gene related peptide*) y la sustancia P. El primero favorecerá la vasodilatación arteriolar y el segundo aumentará la permeabilidad de las vénulas post-capilares provocando la generación del exudado inflamatorio o edema (Mikami, Fukada et al. 2012). Es importante señalar que esta activación de mastocitos tam-

bién se puede inducir por la acción de las anafilotoxinas (C3a y C5a) producidas como consecuencia de la activación del complemento. Los mastocitos perivasculares no sólo liberarán neuropéptidos sino también histamina, proteasas, factor de necrosis tumorañ (TNF)- α preformado, prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos, citocinas y quimioquinas (St John and Abraham 2013). La extravasación de leucocitos se verá favorecida por la presencia de los factores quimioattractantes y por la neoexpresión o el incremento de expresión de moléculas de adhesión endotelial. Ambos, factores quimioattractantes y moléculas de adhesión, se expresan localmente por la acción de las citocinas producidas por los macrófagos que han sido activados a través de alguno o varios de los RRP. Esto crea un sitio

propicio para el reclutamiento de leucocitos que ocurre de manera secuencial y temporal.

■ B) INFLAMACIÓN: RECLUTAMIENTO CELULAR

En términos generales, frente a una infección bacteriana, a partir de las dos primeras horas de iniciado el proceso y por un período de 2-4 horas, en el foco inflamatorio se reclutan los leucocitos polimorfonucleares (PMNLs) en particular los neutrófilos (Kolaczowska and Kubes 2013). Posteriormente, a partir de las 4 horas y por un período de 24 horas comienzan a reclutarse los monocitos los que al extravasarse se convierten en macrófagos. Por último migran los linfocitos proceso que se mantiene por el término de 48-72 horas. Esta secuencia tempo-

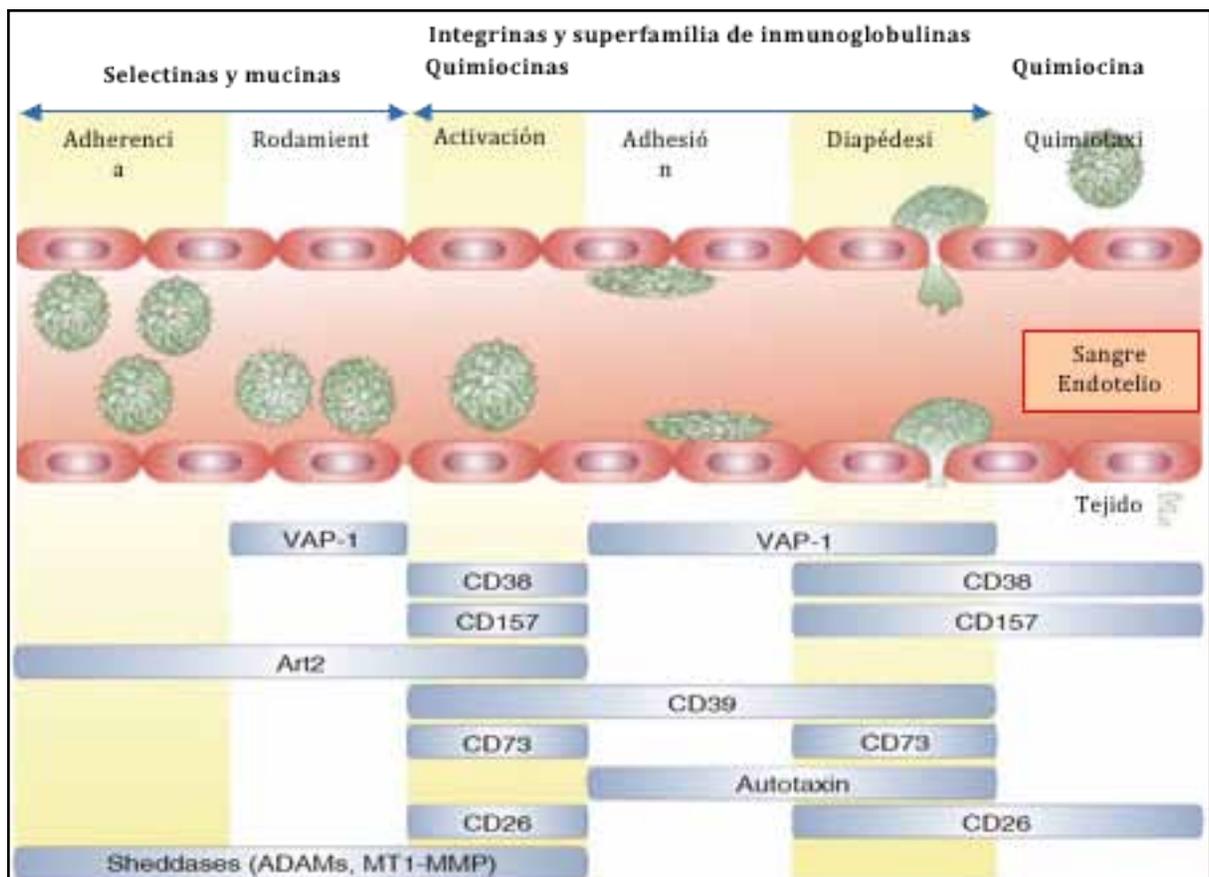


Figura 1. Cascada de adhesión y migración leucocitaria. Se muestran las etapas de cada una de las etapas de la cascada y las moléculas participantes en cada una de ellas. Por debajo se observan las ectoenzimas involucradas en la extravasación de leucocitos. (Figura adaptada de *Nat Rev Immunol* 5(10): 760-71).

ral se da para el caso de inflamaciones agudas. En cambio, en el caso de inflamaciones crónicas predomina el reclutamiento de linfocitos por sobre los neutrófilos. Sin embargo, aún en los procesos agudos o en los procesos crónicos esta cinética de migración secuencial de poblaciones leucocitarias podrá variar dependiendo del territorio vascular involucrado.

En la actualidad se ha determinado que el proceso de extravasación de leucocitos sigue un modelo denominado "cascada de adhesión y migración leucocitaria" que incluye las siguientes etapas: 1) interacción inicial leucocito-endotelio; 2) rodamiento de leucocitos sobre el endotelio; 3) activación leucocitaria; 4) adhesión firme al endotelio; y 5) migración transendotelial. En cada una de estas etapas participan en forma concertada y secuencial diversas moléculas de adhesión y factores quimioattractantes que varían en función del tipo celular migrante, de la duración del proceso y del tejido donde ocurre la migración (Williams, Azcutia et al. 2011).

Normalmente se reconocen factores quimioattractantes clasificados como clásicos y quimiocinas. Estas últimas constituyen una familia de proteínas caracterizadas por contener en su molécula cuatro restos de cisteína que forman cuatro enlaces de disulfuro intracatenarios. Según la posición de las cisteínas las quimiocinas se han clasificado en cuatro familias: CXC, CC, CX3C y C. Este sistema de quimiocinas es un sistema redundante y promiscuo ya que un ligando puede actuar sobre varios receptores y un mismo receptor se puede encontrar sobre diferentes tipos celulares. Quizás uno de los aspectos más interesantes de las quimiocinas es que estas moléculas no sólo actúan atrayendo diferentes poblaciones leucocitarias

sino también intervienen en la organogénesis, tienen actividad angiogénica y angiostática, activan ciertas moléculas de adhesión leucocitarias (por ejemplo integrinas) para favorecer la adhesión celular y facilitan funciones efectoras de los leucocitos (Blanchet, Langer et al. 2012).

Las moléculas de adhesión celular son múltiples y se han clasificado en diversos grupos de acuerdo a semejanzas estructurales y funcionales (Smith 2008). Estos grupos son denominados familias o superfamilias dependiendo de cuán estrecha sea la similitud entre los diversos miembros de un grupo en particular. La mayor parte de las moléculas de adhesión celular se han incluido en las siguientes familias y superfamilias: *selectinas*, *integrinas*, *superfamilia de inmunoglobulinas*, *mucinas* y *cadherinas*. Las interacciones entre diferentes componentes pueden ser de tipo homotípicas o heterotípicas y varían según el tiempo de interacción desde interacciones transitorias, mediadas por selectinas y mucinas, hasta interacciones estables, mediadas por miembros de la superfamilia de inmunoglobulinas (Smith 2008).

El inicio de la migración de los leucocitos requiere de un endotelio activado siendo una molécula de adhesión endotelial, denominada P-selectina, la encargada de iniciar la etapa de rodamiento celular sobre el endotelio vascular. Esta P-selectina junto a una glicoproteína multimérica que participa en el proceso de la hemostasia, denominada factor de von Willebrand, se encuentra presintetizada en los gránulos de Weibel Palade en las células endoteliales. Por lo tanto, su expresión superficial se adquiere rápidamente. Otras selectinas que participan en la etapa de rodamiento son la L-selectina que se encuentra en la superficie de los leucocitos y la E-selectina sobre

la superficie del endotelio. Sin embargo, la expresión de esta última es más tardía. Hay que tener en cuenta que los leucocitos viajan en el torrente sanguíneo a una velocidad de 120 $\mu\text{m}/\text{seg}$ y que las selectinas reducen la velocidad a 20-40 $\mu\text{m}/\text{seg}$ (Williams, Azcutia et al. 2011).

Las siguientes etapas en la cascada de adhesión están mediadas por integrinas sobre la superficie leucocitaria siendo la integrina CD18 una de las más importantes para la migración de neutrófilos y monocitos. Sus ligandos endoteliales pertenecen a la superfamilia de inmunoglobulinas como ICAM-1, ICAM-2 y VCAM-1 y también proteínas de matriz extracelular que se exponen en respuesta al daño. La migración ocurre a través de las uniones interendoteliales favorecidas por el gradiente de quimioattractantes (**Figura 1**).

Recientemente, se ha identificado que la interacción endotelio-leucocito es también mediada por reacciones enzimáticas catalizadas por enzimas presentes sobre la superficie celular plasmática, denominadas ectoenzimas (Salmi and Jalkanen 2012). Las ectoenzimas tienen su sitio activo en la parte externa de la membrana plasmática, clasificándose según su actividad enzimática en:

i) Peptidasas (eliminan aminoácidos del extremo de péptidos); ii) Proteasas (clivan proteínas); iii) Hidrolasas y nucleotidasas: hidrolizan nucleótidos extracelulares; iv) Oxidasas (oxidan varios sustratos). Muchas ectoenzimas son proteínas integrales de membrana de tipo II con un extremo N terminal en el citosol o son moléculas unidas a glicosilfosfatidilinositol. Otras, también se las encuentran de manera soluble en líquidos biológicos, como por ejemplo CD26, CD38, CD73, autotaxina

y VAP-1. Todas ellas presentan funciones relevantes en el proceso de migración celular. Por ejemplo i) CD39 y CD73 regulan el balance entre ATP y adenosina y la activación de integrinas, las moléculas de adhesión vascular y la permeabilidad endotelial; ii) CD26 modifica la actividad de quimiocinas; iii) Sheddasas clivan moléculas como CD62L y CD44; iv) CD38, CD157 y ART2 (ADP ribosyltransferase 2) están involucradas en el metabolismo de NAD y NADP, y controlan señales desencadenadas por interacción ligando-receptor de quimiocinas (ART2 también produce modificaciones post-translacionales de moléculas de adhesión); v) VAP1 (vascu-

lar adhesion protein 1) unen leucocitos y producen productos bioactivos como H_2O_2 ; vi) Autotaxina está involucrada en el metabolismo de nucleótidos y lípidos bioactivos extracelulares.

En definitiva, las ectoenzimas funcionan como receptores de adhesión que regulan el reclutamiento celular modificando la actividad catalítica y regulando los niveles de ATP y sus metabolitos. Esta regulación es muy importante ya que el ATP puede unirse a receptores purinérgicos de la familia P2X y P2Y, siendo los mismos pro-inflamatorios. En condiciones fisiológicas, en ausencia de inflamación el ATP ex-

tracelular es defosforilado a ADP y a AMP por CD39, aunque el ATP también puede ser hidrolizado a AMP por la autotaxina. A su vez, el AMP es defosforilado a adenosina por CD73. La Adenosina se une a receptores P1 y es anti-inflamatorio. Pero cuando un leucocito se une al endotelio vascular durante un proceso inflamatorio la actividad enzimática de CD73 es inhibida produciéndose menos adenosina; (la adenosina se degrada a inosina por la adenosina deaminasa). De esta manera, del balance de ATP, ADP, AMP y adenosina, resultará un microambiente pro o anti-inflamatorio (Salmi and Jalkanen 2005).

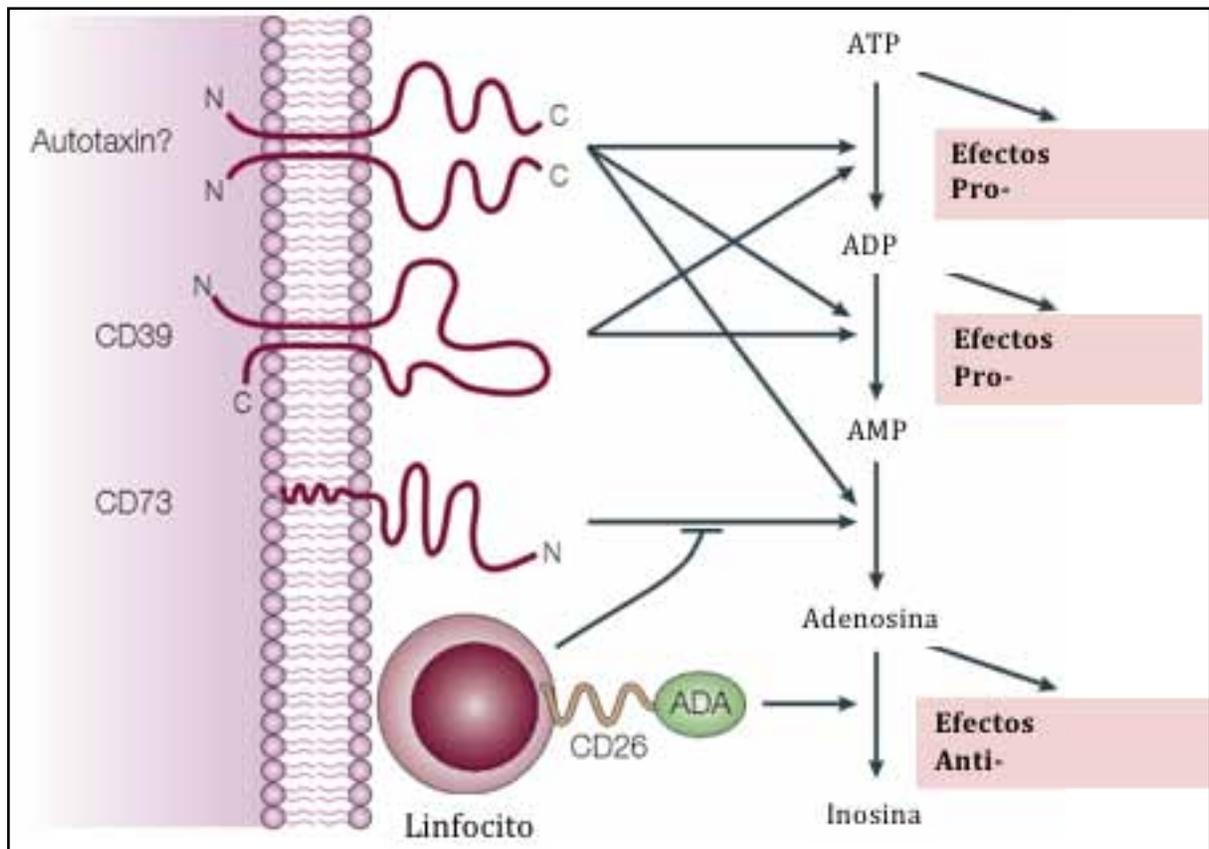


Figura 2. Metabolismo extracelular del ATP en el tráfico leucocitario. En un endotelio no activado, el ATP extracelular es defosforilado a ADP y a AMP por la ectoenzima CD39. El AMP es defosforilado a adenosina por CD73. El ATP ejerce efectos pro-inflamatorios al unirse a receptores purinérgicos de la familia P2X y P2Y. En cambio, la adenosina ejerce efectos anti-inflamatorios al unirse a receptores purinérgicos P1. La unión de los leucocitos al endotelio inhibe la actividad enzimática de CD73 produciéndose menos adenosina. Además, la adenosina se degrada a inosina por la adenosina deaminasa (ADA) que está unida a los linfocitos aumentando la actividad migratoria. (Figura adaptada de *Nat Rev Immunol* 5(10): 760-71)

■ C) INFLAMACIÓN: DAÑO POR PROTEASAS

Una vez en el foco inflamatorio, las células activadas producirán diferentes factores que dependerán del tipo celular reclutado y del microambiente en el cual se encuentren. En lo que respecta al tipo celular reclutado, los factores presentes en los gránulos de los neutrófilos, eosinófilos, basófilos y monocitos difieren en calidad y cantidad. Pero en general, los factores liberados por degranulación celular tienen como objetivo la destrucción de la noxa de manera inespecífica. Esta inespecificidad de la acción, en muchas ocasiones, logra la erradicación de la noxa pero también impacta sobre las células y tejidos del huésped provocando un perjuicio sobre el órgano o el sistema. Esto tiene repercusiones mucho más dramáticas, principalmente, en parénquimas lábiles como el pulmón (Morales, Zurawska et al. 2006). Recordemos que el pulmón es una estructura elástica y distensible conformada por alvéolos

separados por tabiques alveolares constituidos por fibras de tejido conectivo (elastina y colágeno). Este tejido es el que se verá dañado frente a los procesos infecciosos pulmonares reiterados, provocando la destrucción de los tabiques alveolares y la fusión de los alvéolos llevando, con el tiempo, a un enfisema pulmonar.

Aunque existen muchas serino-proteasas, uno de los principales factores que contribuyen a la destrucción del tejido conectivo es la elastasa neutrofílica (Meyer-Hoffert and Wiedow 2010). Esta enzima se encuentra dentro de los gránulos azurófilos de los neutrófilos. Teniendo en cuenta que los PMNLs contienen 399 ± 20 gránulos azurófilos, con un volumen de $2,09 \times 10^{-14}$ ml/gránulo y que cada gránulo contiene 67000 moléculas de elastasa se estima que la concentración de esta serino proteasa en el microambiente de los PMNL puede alcanzar una concentración de 5,33 mM (Damiano 1989).

Los efectos deletéreos de esta serino-proteasas liberadas por los PMNLs a nivel tisular son un fenómeno muy bien conocido, habiéndose descrito a nivel pulmonar la hiperplasia de glándulas mucosas, la hipersecreción de moco, una reducción en la frecuencia del movimiento ciliar, la destrucción epitelial y edema y, en última instancia, el desarrollo de enfisema a nivel del parénquima pulmonar (Damiano 1989).

La elastasa neutrofílica no es el único componente de los gránulos de los neutrófilos. También se encuentran otras serino-proteasas como la proteinasa 3 y la catepsina G. Todas ellas se encuentran almacenadas en altas cantidades en los gránulos azurófilos de los PMNLs y actúan junto con las especies reactivas del oxígeno para destruir a los microorganismos que han sido fagocitados y se encuentran dentro de los fagolisosomas.

Tabla 2. Proteasas-antiproteasas

Proteasas	Actividad	Consecuencias Patofisiológicas	Inhibidor Natural
Elastasa Neutrofílica	Secretagogo de moco Síntesis y secreción de mucina Degradación de Factor Surfactante	Aumenta producción de moco Aumenta producción de moco Pérdida de función del Factor Surfactante	SLPI α 1AT Inhibidor de TACE (TAPI-1) serpinb1
ADAMs	Síntesis y secreción de mucina	Aumenta producción de moco	TAPI-1
HAT	Síntesis y secreción de mucina	Aumenta producción de moco	TAPI-1
Elastasa	Degradación de Factor Surfactante	Pérdida de función del Factor Surfactante	Inhibidor de metaloproteasas
Proteasa IV	Degradación de Factor Surfactante	Pérdida de función del Factor Surfactante	Inhibidores de serinoproteasas de tipo tripsina
Cistein Proteasas (alergenos)	Degradación de Factor Surfactante	Pérdida de función del Factor Surfactante	Iodoacetamida

Las especies reactivas del oxígeno también ejercen efectos nocivos sobre los tejidos. Sin embargo, es importante señalar que los efectos nocivos de las especies reactivas del oxígeno se verán únicamente cuando la concentración de las mismas

sea elevada. Estas concentraciones altas de las especies reactivas del oxígeno inducirán la secreción o liberación de DAMPs y la activación de los receptores asociados a daño celular. En cambio, con concentraciones bajas las especies reactivas

del oxígeno participan en la señalización de segundos mensajeros. El mecanismo de producción y modulación de las especies reactivas del oxígeno excede la temática de esta revisión pero se puede consultar en la bibliografía que se cita (Rosanna and Salvatore 2012).

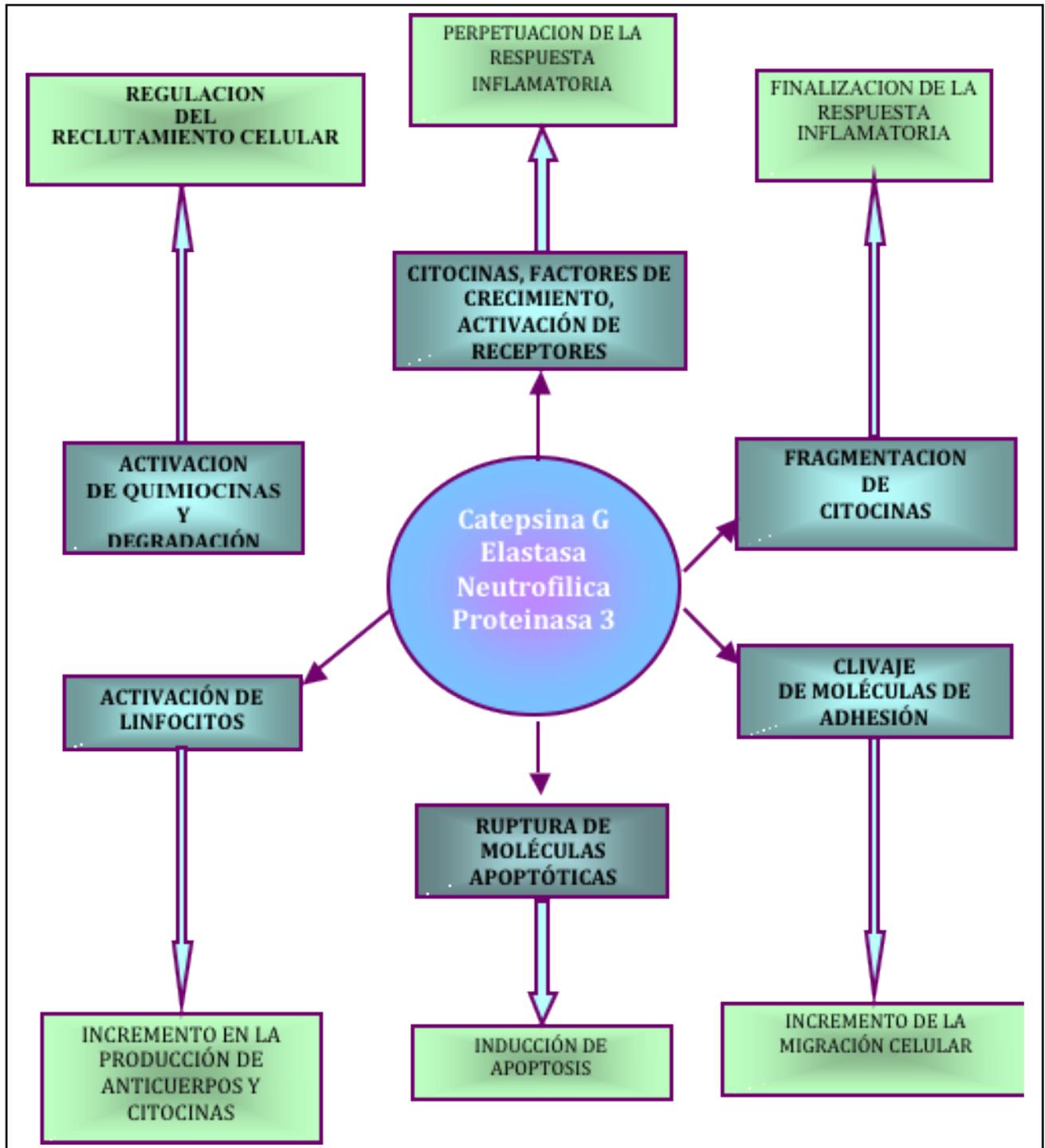


Figura 3. Proteasas Neutrofílicas La elastasa neutrofílica no es el único componente de los gránulos de los neutrófilos. También se encuentran otras serino-proteasas como la proteinasa 3 (PR3) y la catepsina G (CG). La figura muestra todas las funciones asociadas a las proteasas neutrofílicas.

Las proteasas pueden encontrarse normalmente en el interior celular pero muchas de ellas son secretadas en forma activa en el foco inflamatorio ejerciendo efectos microbicidas extracelulares e inmunomoduladores. De esta manera, podríamos resumir las funciones de la elastasa neutrofílica y de las otras serino-proteasas neutrofílicas en funciones intracelulares (por ejemplo la degradación de micro-organismos fagocitados) y funciones extracelulares. Estas últimas involucran la inactivación de

bacterias extracelulares, la degradación de la matriz extracelular, la remodelación tisular, la facilitación del reclutamiento de neutrófilos, la activación de TLR4, el clivado de moléculas de superficie como CD14, CR1 y el receptor de IL-6, la inducción de determinadas citocinas (IL-6, IL-8, TGF- β , GM-CSF) y la degradación de otras (IL-1, TNF- α , IL-2, IL-18) (Meyer-Hoffert and Wiedow 2010). A nivel plaquetario, aumenta la agregación al activar la integrina α IIb β 3. Además, se ha descrito que induce

la liberación de catepsina B y metaloproteasas (MMP2) y perjudica el reconocimiento de células apoptóticas (Geraghty, Rogan et al. 2007). Se sabe que los pacientes que padecen neutropenia cíclica congénita presentan una deficiencia en la elastasa neutrofílica. Estos pacientes padecen infecciones recurrentes con *Escherichia Coli* y *Klebsiella pneumonia* poniendo así en evidencia la importancia de la elastasa en los fenómenos microbicidas (Boztug, Appaswamy et al. 2009).

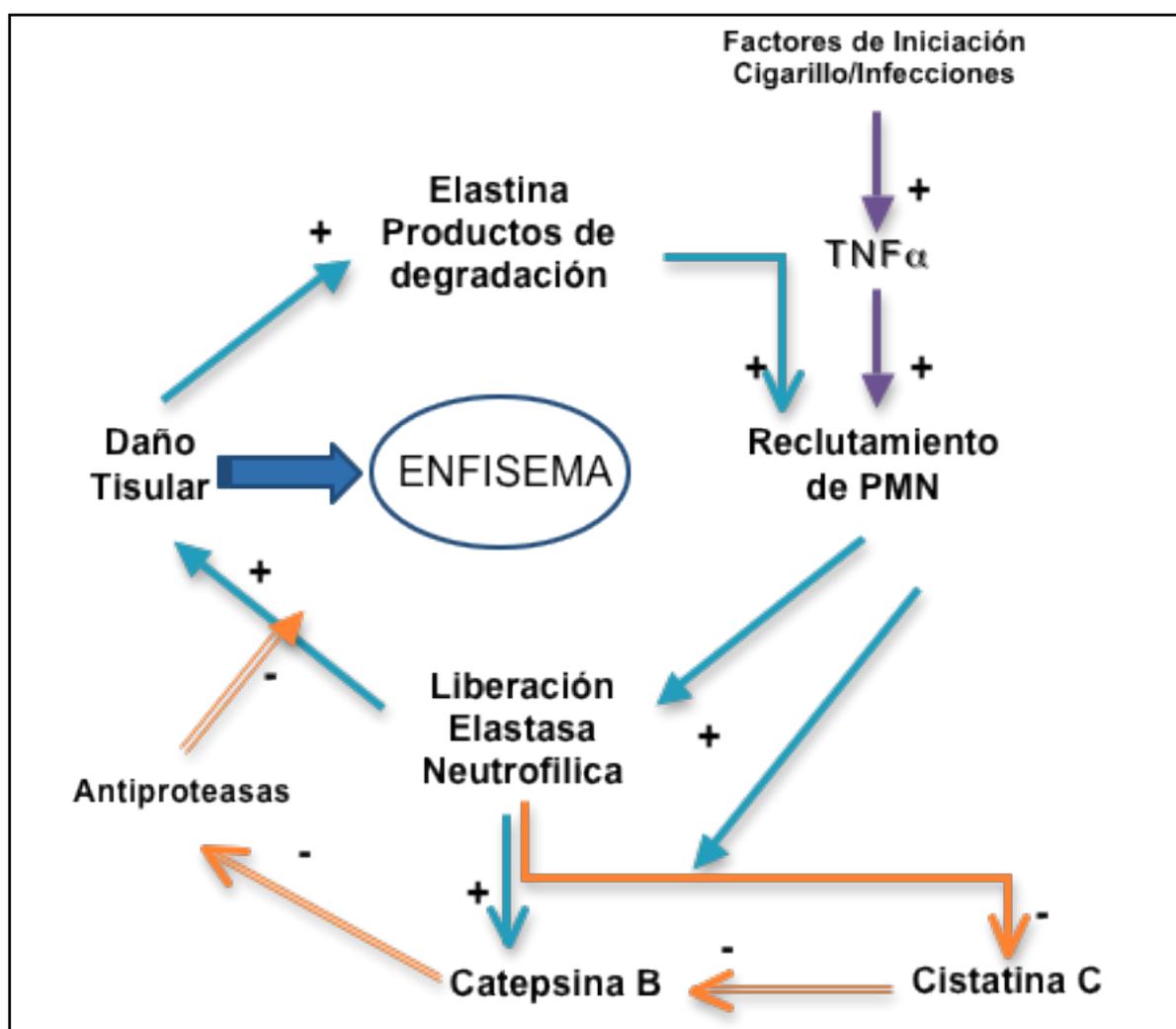


Figura 4. Patología del enfisema pulmonar. El cigarrillo o el humo del cigarrillo estimulan la producción de la citoquina TNF- α que activa el endotelio vascular aumentando la expresión de moléculas de adhesión y quimiocinas y reclutando neutrófilos. Los neutrófilos liberan elastasa, provocando la destrucción de la pared alveolar compuesta principalmente por elastina. La acción de la elastasa sobre la pared alveolar puede generar productos de degradación que atraen más PMN, liberando más proteasas y provocando una mayor destrucción tisular. La actividad de las proteasas neutrofílicas es controlada por la acción de inhibidores de proteasas locales y sistémicos. Cuando la inhibición es insuficiente se pueden provocar cuadros de enfisema.

Las serino-proteasas también participan en la formación de los NET (*neutrophil extracellular traps*). Las NET son estructuras generadas por la secreción de ADN que han sido liberadas por el neutrófilo activado que se adhieren a moléculas cargadas positivamente como por ejemplo serino-proteasas o histonas. Estas NET reducen la virulencia del patógeno al degradar componentes esenciales del mismo (Kaplan and Radic 2012).

Normalmente, es posible encontrar niveles elevados de proteasas en todas aquellas situaciones donde hay un incremento de TNF- α . Por ejemplo, el humo del tabaco incrementa la producción de TNF- α que al activar el endotelio vascular promueve la migración y activación de neutrófilos con la consiguiente liberación de las proteasas como elastasa y catepsina. En condiciones fisiológicas, la catepsina se encuentra en un estado inactivo debido a la acción de una proteína plasmática denominada cistatina C. Sin embargo, la elastasa neutrofilica inhibe la cistatina C y activa la catepsina. De esta manera, la elastasa junto a la catepsina provocarán un daño tisular con degradación de las fibras de elastina si sus niveles no son controlados por los inhibidores de serino-proteasas sistémicos o locales (Geraghty, Rogan et al. 2007). De hecho, los mismos productos de degradación de elastina son inductores de TNF- α que puede llevar a un círculo vicioso con mayor secreción y activación de proteasas. Este círculo vicioso a nivel pulmonar terminará por provocar un cuadro enfisematoso.

En cuanto a los efectos inmunomodulares de las serino-proteasas merecen una mención especial sus efectos sobre las principales células presentadoras de antígeno profesionales: las células dendríticas (CDs).

Sobre las mismas se han descrito varios efectos entre los que se destaca el clivaje de CD40, CD80 y CD86. Además, en nuestro laboratorio describimos que la elastasa neutrofilica induce la producción de TGF- β en las CDs transformando estas CDs proinflamatorias en CDs tolerigénicas (Maffia, Zittermann et al. 2007). Estos efectos pudieron ser reproducidos por neutrófilos derivados de personas sanas pero no por neutrófilos provenientes de pacientes con neutropenia cíclica. Como fuera mencionado más arriba, estos pacientes se caracterizan por presentar niveles bajos o ausentes de elastasa neutrofilica confirmando de esta manera que la elastasa neutrofilica es responsable de transformar a las CDs proinflamatorias en CDs tolerigénicas. Estos hallazgos fueron corroborados por otros autores, y hoy se sabe que los neutrófilos pueden ejercer efectos tanto activadores como inhibitorios sobre las CDs y que estos efectos dependerán del microorganismo invasor y del microambiente donde ocurra la interacción entre el neutrófilo y la CDs (Schuster, Hurrell et al. 2012). Cabe destacar que en caso que el efecto de las serino-proteasas sobre el funcionamiento de las CDs perjudique su capacidad inmunoestimuladora es muy probable que la misma genere una mayor susceptibilidad a las infecciones, las que en última instancia llevan a un mayor reclutamiento de fagocitos, liberación de enzimas y mayor daño tisular incluyendo a las células inmunocompetentes. A favor de esta hipótesis se encuentran las acciones descritas para la elastasa sobre el clivaje de receptores que en última instancia impedirían la maduración de las células presentadoras de antígenos. El clivaje de proteínas de superficie también se observa sobre linfocitos T y B que favorece la activación de estas células y el aumento consiguiente de la producción de citocinas y la respuesta inmune humoral.

En definitiva las serino-proteasas son enzimas que se encuentran libres o incluso asociadas a la membrana de las células. Ambas formas son activas y por lo tanto pueden ejercer efectos inmunomoduladores regulando la actividad de quimocinas, citocinas, factores de crecimiento y receptores de superficie. En cuanto a sus actividades sobre receptores celulares, se observó que las serino-proteasas pueden procesar el dominio N-terminal del receptor activado por proteasas (PARs) generando la autoactivación del receptor. Este efecto no es inespecífico ya que mientras la trombina (otra serino-proteasa) puede activar a PAR-1, PAR-3 y PAR-4, la catepsina G activa PAR-4 en la superficie de las plaquetas iniciando el proceso de agregación plaquetaria. Por otro lado, la tripsina activa PAR-2 en la superficie endotelial aumentando la producción y secreción de IL-8 y de la quimiocina CCL2 en tanto que la elastasa aumenta la expresión de TLR4 incrementando el reclutamiento de neutrófilos. También fue descrito que la proteinasa 3 (PR3) es captada por la célula endotelial y provoca la apoptosis de la misma aparentemente como un mecanismo de control del proceso inflamatorio (Ossovskaia and Bunnett 2004).

■ D) INFLAMACIÓN: PROTECCIÓN DEL DAÑO POR ANTIPROTEASAS

El efecto deletéreo de las serino-proteasas secretadas por los leucocitos a nivel de los tejidos es un fenómeno muy bien conocido. Son ejemplos de un efecto exagerado de las serino-proteasas aquellas enfermedades en donde existe un desbalance entre la acción de las serino-proteasas y sus inhibidores naturales, las serpinas (Sallenave and Shapiro 2008). Actualmente se reconocen serpinas sistémicas como la α 1-antitripsina y locales como

el inhibidor secretorio de proteasas leucocitarias (SLPI) y Trappin-2 (también llamado SKALP -*skin-derived anti-leukoproteinase*- o ELAFIN -*elastase-specific inhibitor*-). La importancia de las mismas queda de manifiesto en las enfermedades generadas por la ausencia o deficiencia de serpinas como por ejemplo la deficiencia de α 1-antitripsina y la fibrosis quística. La primera, es una enfermedad hereditaria autosómica recesiva que afecta a los descendientes de Europeos (una de cada 10 personas descendientes de europeos es portador de una mutación), caracterizada por niveles séricos bajos de α 1-antitripsina. Esta serpina es una glicoproteína producida principalmente por los hepatocitos y los macrófagos alveolares. Su función principal es inhibir las serino-proteasas (en particular elastasa) liberadas por los PMNLs reclutados a nivel del parénquima pulmonar en respuesta a la colonización de patógenos pero recientemente se describieron importantes funciones inmunomodulatorias (Hunt and Tudor 2012). Las manifestaciones clínicas en estos pacientes se presentan alrededor de la tercera o cuarta década de la vida con enfisema panlobular. La evolución de la enfermedad puede acelerarse por el hábito de fumar cigarrillos o por enfermedades inflamatorias respiratorias. En algunos casos, la enfermedad se manifiesta en los niños con daño hepático. Resulta interesante señalar que la deficiencia del inhibidor no ocurre por una falta de síntesis hepática sino a un bloqueo en el procesamiento y secreción de la proteína que lleva a la formación de agregados dentro del retículo endoplásmico del hepatocito y a su muerte. La formación de estos polímeros intracelulares aumenta a altas temperaturas y se debe a la facilidad de las serpinas de sufrir cambios conformacionales. Un mecanismo de daño similar pero sobre las neuronas se ha descrito en la

enfermedad de Alzheimer con las neuroserpinas.

Por otro lado, en la fibrosis quística, enfermedad genética y hereditaria, también existe un desbalance entre las proteasas y sus inhibidores. Sin embargo, en este caso se produce por una mutación en un gen que codifica para una proteína reguladora de la conductancia de iones (principalmente cloro) dependiente de AMPc (CFTR). Las consecuencias de este defecto es la retención de agua favoreciendo la generación de secreciones viscosas que obstruyen los bronquios e impide el funcionamiento normal de las cilias del epitelio bronquial (lo mismo se observa a nivel gastrointestinal, hepatobiliar y pancreático). El resultado final es un exagerado influjo de neutrófilos debido a infecciones pulmonares crónicas y un desbalance del equilibrio entre serino-proteasas y serpinas.

Existen otras patologías crónicas asociadas a una actividad excesiva, inapropiada o prolongada de las proteasas liberadas por los PMNLs como por ejemplo la artritis reumatoidea y la colitis ulcerosa. Independientemente de la patología de base las infecciones o los procesos inflamatorios crónicos aceleran o empeoran la evolución de estas enfermedades.

Cuando tiene lugar una infección en el organismo, las respuestas del sistema inmune innato controlan la diseminación del patógeno pero más tardíamente se requiere la respuesta inmune adaptativa mediada por los linfocitos T y B para la contención del patógeno. Así, el destino de un individuo expuesto a un patógeno va a estar determinado por varios factores incluyendo sus características genéticas y la fuerza y especificidad de los mecanismos de defensa endógenos montados contra el

patógeno. Por lo tanto, uno se puede cuestionar ¿cómo es posible que el sistema haya generado un mecanismo microbicida tan potente mediado por las serino-proteasas junto a un sistema de control tan eficiente que bloquee no solamente la actividad proteolítica sino también la actividad microbicida? Esto es debido a que limitar la actividad microbicida sería de alguna manera dejar más expuesto al individuo a la acción de los patógenos. Sin embargo, limitar la actividad proteolítica de las serino-proteasas no implica necesariamente limitar la actividad microbicida. Esto se debe a que muchos de los inhibidores de serino-proteasas, en particular los producidos localmente son, al igual que las serino-proteasas, péptidos antimicrobianos que tienen una amplia actividad microbicida. Es decir, el sistema limita el daño de las serino-proteasas pero la actividad microbicida presente en el microambiente inflamatorio, muy por el contrario, aumenta aún más por la presencia de los inhibidores de serino-proteasas.

La co-evolución de los huéspedes y patógenos ha llevado a que el huésped produzca diversos grupos de péptidos con el objeto de matar o reducir los patógenos. Estos péptidos se denominan péptidos antimicrobianos (antimicrobial peptides, AMPs) y se pueden encontrar en casi todas las formas de vida, en organismos como bacterias o plantas y también en especies invertebradas y vertebradas incluyendo los mamíferos (Nguyen, Haney et al. 2011). Entre estos últimos, los humanos tienen diversos tipos celulares que sintetizan y secretan AMPs tales como las células epiteliales, los queratinocitos epidérmicos, los neutrófilos, los macrófagos y las células *natural killer* (NK). En los mamíferos, estos AMPs pueden ser considerados como parte del sistema inmune innato. Ellos son capaces de unir y

matar al patógeno pero aún no se ha demostrado si la mayoría de estos péptidos se une específicamente a los PAMPs y si facilitan la acción de los macrófagos. Hasta la fecha, se han descubierto y descrito más de 1400 AMPs en numerosas especies. Algunos de estos AMPs también son serpinas, como los ya mencionados más arriba, SLPI y ELAFIN/Trappin-2 (Sallenave 2010).

Resulta llamativo que algunos AMPs tienen actividad inmunomoduladora al igual que las serino-proteasas. Por ejemplo, algunos AMP son agentes quimiotácticos de monocitos humanos y células T y modulan la diferenciación de CD4 y la polarización de células T inducida por CD4 (Davidson, Currie et al. 2004). Otros, como las α -defensinas, pueden también funcionar como reguladores de una retroalimentación negativa del efecto de la interleuquina-1 β (IL-1 β) facilitando la resolución de la inflamación (Shi, Aono et al. 2007). De esta manera, es posible que una desregulación del control de la retroalimentación, por ejemplo, a través de la secreción de AMPs que participan como reguladores del proceso pueda amplificar y perpetuar un proceso inflamatorio.

Son muchas las funciones y actividades descritas para estos péptidos. Los péptidos catiónicos tales como los péptidos neutrofílicos humanos 1-3 (HNP1-3), LL-37 y el SLPI están presentes a niveles detectables en las secreciones cervicovaginales pero en general se los encuentra en la mayoría de las secreciones mucosas. Resulta interesante la actividad antiviral de muchos de ellos. Por ejemplo, los péptidos HNP1-3 son miembros de la familia de las α -defensinas e inhiben la replicación del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) a través de la interferencia intracelular con la actividad de proteín-quinasa C e inactivación

de los viriones de VIH. Por otro lado, el péptido LL-37 que pertenece a la familia de las catelicidinas y que también media la actividad inhibitoria de VIH tiene un mecanismo anti-retroviral aún no dilucidado. Por último, el SLPI ejercería su efecto anti-retroviral por unión a la anexina II e impidiendo la estabilización de la fusión a la membrana mediada por esta molécula. Pero además de sus actividades bactericidas, antivirales y fungicidas estas moléculas han demostrado tener actividad inmunomoduladora no sólo a nivel de la respuesta inmune innata sino también adaptativa. Siendo el SLPI la molécula más estudiada por nuestro grupo de trabajo, nos detendremos a analizar con más detalle sus actividades inmunomoduladoras.

■ E) INFLAMACIÓN: SLPI

El SLPI es una proteína básica (pI \approx 9,5) no glicosilada de 107 aminoácidos con un peso molecular de 11,7 kDa. Esta 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. Estos dominios ricos en cisteína son también llamados dominios WAP porque fueron hallados inicialmente en la proteína ácida del suero (del inglés *wey acidid protein*) que 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.

El SLPI se encuentra 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 claras 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. La expresión del SLPI se encuentra significativamente aumentada por la progesterona y por las citocinas proinflamatorias TNF- α e IL-1 β (Sallenave and Shapiro 2008). La concentración fisiológica del SLPI en saliva es de 0,35 – 2 μ 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 μ M en las vías aéreas superiores y de 0,6 μ M en el tracto respiratorio inferior. Sin embargo, pacientes con enfisema pulmonar mostraron niveles significativamente inferiores de SLPI que los observados en los pacientes sanos (Taggart, Lowe et al. 2001).

Se ha descrito al SLPI como una molécula con capacidad para promover la cicatrización de heridas. Utilizando ratones "knock out" para SLPI se observó un retraso de la cicatrización de heridas cutáneas atribuido a la 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 y la tercera sería

la disminución de la actividad de TGF- β (Ashcroft, Lei et al. 2000).

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. Asimismo, en las células epiteliales del endometrio el SLPI ejercería una regulación positiva y negativa sobre genes asociados al crecimiento tales como ciclina D1 y TGF- β , respectivamente (Sallenave and Shapiro 2008).

El 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. 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. Ha sido propuesto que el dominio 1 ayudaría a estabilizar el complejo SLPI – elastasa. La gran afinidad del SLPI por las serino-proteasas neutrofílicas y su alta concentración local en el compartimiento bronquial (cerca de 5 μ M) sugiere que su principal función fisiológica es regular cualquier actividad excesiva de las serino-proteasas neutrofílicas en las vías aéreas superiores. El SLPI sería producido localmente y colaboraría en la acción anti-elastasa de la α 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 sugiriendo que previene la proteólisis

de elastina. Además de su rol en los pulmones, se cree que el SLPI está involucrado en el control de la proteólisis inducida por proteasas neutrofílicas en los sitios de inflamación como en las superficies de las mucosas. Por otro lado, proteasas de agentes patógenos pueden clivar al SLPI alterando de esta forma sus propiedades inhibitorias (Taggart, Lowe et al. 2001). 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 que se caracterizan por una excesiva carga de proteasas de origen endógeno o bacteriano, un aumento del stress oxidativo y el consiguiente daño al tejido.

Por otro lado el SLPI posee propiedades antimicrobianas tanto *in vitro* como *in vivo*. La actividad antimicrobial ha sido descrita para *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus sp.*, *Aspergillus fumigatus* y *Candida albicans* (Sallenave 2010). Además, el SLPI posee actividad antimicrobiana contra micobacterias. 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 (Nishimura, Saiga et al. 2008; Gomez, Arguelles et al. 2009). La actividad antimicobacteria del SLPI reside en el dominio WAP de la proteína y es muy parecida a otros péptidos catiónicos.

La expresión de SLPI puede ser aumentada en respuesta a estímulo

los inflamatorios como TNF- α y *M. tuberculosis* e inhibida por adenovirus y TGF- β (Sallenave and Shapiro 2008). 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 citocinas proinflamatorias. La actividad antiinflamatoria también esta mediada por la inhibición de la degradación proteolítica de $\text{I}\kappa\text{B}$ y de la inhibición de la activación del factor de transcripción NF- κB (Sallenave and Shapiro 2008). Además, el SLPI protege la degradación de factores que permiten la resolución de la inflamación.

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 con la resolución de la inflamación y la homeostasis (Odaka, Mizuochi et al. 2003). Por último, Samsom et al. propone que la expresión de SLPI en CDs en los ganglios linfáticos cervicales contribuye a generar tolerancia en las mucosas al disminuir la producción de agentes proinflamatorios como IL-12 y MCP-1 (Samsom, van der Marel et al. 2007).

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 (Xu, He et al. 2007). De hecho, en nuestro laboratorio demostramos 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 (Guerrieri, Tateosian et al. 2011). El efecto inhibitorio del SLPI sobre la proliferación fue independiente del estímulo utilizado y también

del efecto anti-serino-proteasa dado que la molécula de SLPI oxidada, 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 puede ser inhibida en el microambiente inflamatorio por proteasas y compuestos derivados del metabolismo del oxígeno liberados por los neutrófilos. El hecho de que la oxidación del SLPI no modifique la actividad inhibitoria sobre la proliferación linfocitaria 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 anti-proteasa, como por ejemplo la actividad microbicida. Por otro lado, también pudimos corroborar que el SLPI modifica el estado de activación linfocitaria al disminuir la expresión de CD25 o cadena α del receptor de alta afinidad para la IL-2.

Un paso clave en la activación linfocitaria es la activación del factor de transcripción NF- κ B. Precisamente, el SLPI impide la translocación de NF- κ B al núcleo y por lo tanto la transcripción de genes proinflamatorios.

Como se ha descrito, los linfocitos CD4 colaboradores o helper se pueden diferenciar hacia distintos perfiles de células T colaboradores. Esto es un proceso crucial de la inmunidad adaptativa ya que define el tipo de respuesta inmune que se desarrollará en el organismo, la cual debería ser apropiada para erradicar al patógeno. En este sentido el SLPI es capaz de inhibir la producción de IFN- γ , una citocina patognomónica de las respuesta de tipo Th1, inducida por microorganismos intracelulares como por ejemplo *Mycobacterium tuberculosis*. El efecto inhibitorio sobre la linfoproliferación y la inhibición del perfil Th1 es mediado por el SLPI a través de los monocitos ya que el SLPI carece de actividad cuando se evalúa en poblaciones de linfocitos depletados de monocitos. Por el contrario, el efecto del péptido se recupera cuando los monocitos son reincorporados al cultivo de linfocitos depletados de monocitos y/o al agregar medios condicionados de monocitos pre-tratados con SLPI (Guerrieri, Tateosian et al. 2011). Aparentemente, el SLPI provoca en los monocitos la liberación de un factor soluble que puede disminuir la proliferación linfocitaria. Estos resultados sugieren la posibilidad

de que el SLPI esté involucrado en un fenómeno de polarización de la respuesta inmune adaptativa.

Como se mencionó en la introducción, el SLPI es el principal inhibidor local de la elastasa neutrofílica liberada en respuesta a la elastasa. Por lo tanto es altamente factible que el SLPI se encuentre en un microambiente donde también exista elastasa. Trabajos previos de nuestro laboratorio demostraron que la elastasa neutrofílica humana inhibe la actividad linfoproliferativa de CD4 en cultivos mixtos alogénicos, aumentando simultáneamente los niveles de TGF- β y disminuyendo los niveles de IL-6 (Maffia, Zittermann et al. 2007). Teniendo en cuenta que la presencia de TGF- β en ausencia de IL-6 polariza a los linfocitos T hacia un perfil regulador, podríamos inferir que la elastasa induce un perfil tolerigénico. De hecho, el tratamiento de las CD4 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- β aumentando simultáneamente los niveles de IL-6 e IL-17. Estos resultados estarían indicando que el SLPI *per se* inhibiría

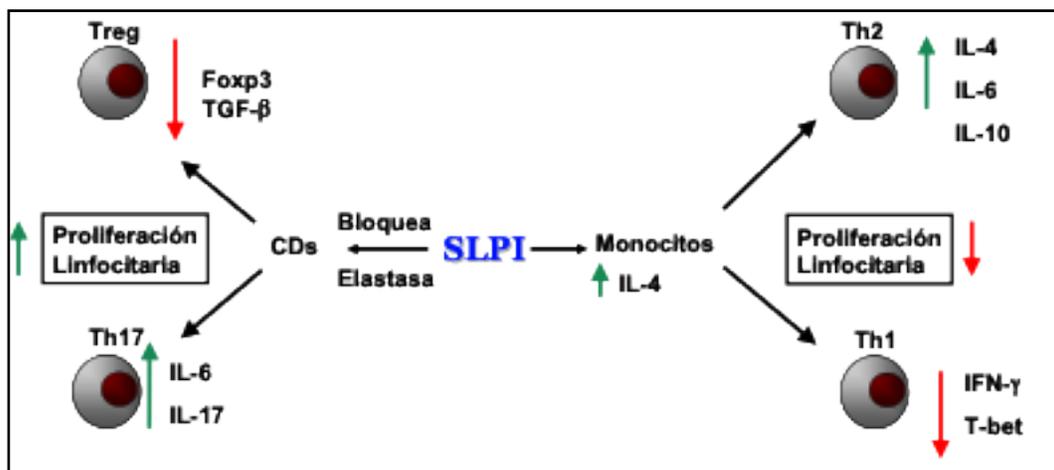


Figura 5 Rol del SLPI como inmunoregulador. El SLPI promueve la generación de CDs que aumentan los linfocitos Th17 y disminuyen la producción de linfocitos Treg. Además, actuando sobre monocitos bloquea la producción de linfocitos Th1 y aumenta la producción de citocinas del perfil Th2 *in vitro*.

la expresión del perfil Th1 y, que en presencia de elastasa, inhibiría la expresión de las Treg favoreciendo la diferenciación hacia un perfil Th17 que está implicado en respuestas inmunes contra bacterias extracelulares y algunos hongos pero también en enfermedades autoinmunes (Sallusto, Zielinski et al. 2012).

Un aspecto que caracteriza a las células Th17 es su alta capacidad de producción de IL-17. Esta citocina estimula la producción de neutrófilos en la médula ósea como así también la producción de TNF- α , IL-6, quimiocinas y metaloproteasas favoreciendo la infiltración local de neutrófilos. Sin embargo, es importante tener en cuenta que la IL-17 presente en el medio no siempre proviene de células Th17. Recientemente, se ha descrito que algunas células linfoides innatas tienen la capacidad de producirla (Sutton, Mielke et al. 2012). Las células linfoides innatas son células linfoides que carecen de receptores antigénicos (TCR o BCR) y que responden rápidamente frente a una variedad de noxas. Su función principal es participar en la formación de tejidos linfoides, la reparación de tejidos dañados, la homeostasis tisular y la inmunidad frente a microorganismos. Solamente un subtipo de estas células linfoides innatas es capaz de producir IL-17 y esta población se caracteriza por expresar el factor de transcripción Ror γ t. Algunas de estas células también producen IL-22 que al actuar sobre células epiteliales aumentan la producción de los péptidos antimicrobianos.

Resulta contradictorio que la elastasa, una molécula que se encuentra implicada en procesos inflamatorios como el daño generado por isquemia-reperfusión, el daño pulmonar agudo inducido por endotoxina y la artritis inducida por colágeno, pueda estar favoreciendo la

generación de células Treg. Por otro lado, es sorprendente que el SLPI, una molécula anti-inflamatoria, esté inhibiendo a 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 que 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- β (Wahl 2007).

Es importante reconocer y diferenciar las acciones fisiológicas de los mediadores de los efectos farmacológicos. Por ejemplo, la capacidad del SLPI de inhibir la manifestación de una enfermedad autoinmune 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 anti-espermáticos. Puede ser consecuencia de obstrucción unilateral del conducto deferente, post-cirugía o post-infección o manifestaciones de una enfermedad sistémica como la poliarteritis nodosa u otros cuadros autoinmunes como el síndrome de Sjögren. La orquitis autoinmune experimental (OAE) es una enfermedad mediada sobre todo por linfocitos T y 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 espermatides, 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 durante la fase efectora de la enfermedad 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 (Guazzone, Guerrieri et al. 2011). 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.

En los experimentos realizados en el modelo de enfermedad autoinmune, quedó demostrado que el SLPI presenta un efecto protector en esta patología. Pero además,

su capacidad inmunomoduladora también fue evaluada en modelos de respuestas inmunes exageradas como por ejemplo las respuestas inmunes alogénicas como las que se observan en el rechazo de trasplante de piel. En este modelo el SLPI también demostró su potencial inmunosupresor ya que los animales tratados con SLPI tardaron más en rechazar el implante. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Schneeberger y col. que demuestran que ratones SLPI^{-/-} presentan mayor necrosis y menor función cardíaca en un modelo de trasplante cardíaco. Además, la administración de SLPI en la solución que preserva el tejido durante la isquemia/reperfusión mejora el funcionamiento del implante (Schneeberger, Hautz et al. 2008).

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, pudimos observar que los niveles de SLPI sérico se correlacionan de manera inversa con los niveles de proliferación de células mononucleares de sangre periférica en pacientes con cáncer de pulmón y con EPOC. Analizando en forma conjunta los pacientes con EPOC y con cáncer de pulmón es posible establecer una concentración plasmática de 60 ng/ml como valor de corte; de tal manera que los pacientes que presentan niveles séricos por encima de 60 ng/ml tienen una proliferación linfocitaria menor, comparada con aquellos pacientes que tienen valores por debajo de 60 ng/ml (datos no publicados).

■ CONCLUSIONES FINALES:

La meta de las terapias que tienen como blanco terapéutico a los neutrófilos es la de suprimir la inflamación como en el caso de la artritis

reumatoidea, la osteoartritis y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica. Sin embargo, las terapias anti-inflamatorias actuales tienen varios inconvenientes. Las terapias con corticoides y anticuerpos monoclonales humanizados aunque son bastante efectivas tienen el inconveniente de presentar reacciones adversas como por ejemplo el aumento de la susceptibilidad a infecciones o su reactivación, tal como es el caso de la tuberculosis latente. 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 debido a 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 podría no ser suficiente para detener la inflamación.

Finalmente, el SLPI tiene capacidad inmunomoduladora al inhibir la proliferación linfocitaria actuando directamente sobre los monocitos, inhibe la expresión de un factor de transcripción característico del perfil Th1, disminuye los niveles de Treg y aumenta 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 implicancia clínica ya que el SLPI podría ser una nueva herramienta terapéutica en procesos inflamatorios crónicos, en patologías donde la terapéutica clásica ha fracasado.

■ GLOSARIO

Complemento: componente de la inmunidad innata humoral
 DAMP: Patrón Molecular Asociado a Daño
 EPOC: Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica
 Noxa: factor capaz de ocasionar perjuicio a un individuo
 Oponizar: proceso que favorece la fagocitosis
 PAMP: Patrón Molecular Asociado a Patógenos
 Quimioattractantes: toda sustancia que atrae algún tipo celular
 SLPI: Inhibidor Secretorio de Proteasas Leucocitarias

■ BIBLIOGRAFIA

- Ashcroft, G. S., K. Lei, et al. (2000). Secretory leukocyte protease inhibitor mediates non-redundant functions necessary for normal wound healing. *Nat Med* **6**: 1147-53.
- Bianchi, M. E. (2007). DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol* **81**: 1-5.
- Blanchet, X., M. Langer, et al. (2012). Touch of chemokines. *Front Immunol* **3**: 175.
- Boztug, K., G. Appaswamy, et al. (2009). A syndrome with congenital neutropenia and mutations in G6PC3. *N Engl J Med* **360**: 32-43.
- Damiano, V. V. (1989). Neutrophil elastase and elastic tissue in emphysema. *J Clin Pathol* **42**: 114-5.
- Davidson, D. J., A. J. Currie, et al. (2004). The cationic antimicrobial peptide LL-37 modulates dendritic cell differentiation and dendritic cell-induced T cell polarization. *J Immunol* **172**: 1146-56.
- Du Clos, T. W. C. Mold (2011). Pentraxins (CRP, SAP) in the process of complement activation and clearance of apoptotic bodies

- through Fcγ receptors. *Curr Opin Organ Transplant* **16**: 15-20.
- Geraghty, P., M. P. Rogan, et al. (2007). Neutrophil elastase up-regulates cathepsin B and matrix metalloprotease-2 expression. *J Immunol* **178**: 5871-8.
- Gomez, S. A., C. L. Arguelles, et al. (2009). Secretory leukocyte protease inhibitor: a secreted pattern recognition receptor for mycobacteria. *Am J Respir Crit Care Med* **179**: 247-53.
- Grutter, M. G., G. Fendrich, et al. (1988). 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* **7**: 345-51.
- Guazzone, V. A., D. Guerrieri, et al. (2011). Micro-encapsulated secretory leukocyte protease inhibitor decreases cell-mediated immune response in autoimmune orchitis. *Life Sci* **89**: 100-6.
- Guerrieri, D., N. L. Tateosian, et al. (2011). Serine leukocyte proteinase inhibitor-treated monocyte inhibits human CD4(+) lymphocyte proliferation. *Immunology* **133**: 434-41.
- Hunt, J. M. and R. Tuder (2012). Alpha 1 anti-trypsin: one protein, many functions. *Curr Mol Med* **12**: 827-35.
- Kaplan, M. J. and M. Radic (2012). Neutrophil extracellular traps: double-edged swords of innate immunity. *J Immunol* **189**: 2689-95.
- Kolaczowska, E. and P. Kubec (2013). Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol* **13**: 159-75.
- Maffia, P. C., S. E. Zittermann, et al. (2007). Neutrophil elastase converts human immature dendritic cells into transforming growth factor-beta1-secreting cells and reduces allostimulatory ability. *Am J Pathol* **171**: 928-37.
- Meyer-Hoffert, U. and O. Wiedow (2011). Neutrophil serine proteases: mediators of innate immune responses. *Curr Opin Hematol* **18**: 19-24.
- Mikami, N., S. Fukada, et al. (2012). Neuronal derivative mediators that regulate cutaneous inflammations. *Crit Rev Immunol* **32**: 307-20.
- Moraes, T. J., J. H. Zurawska, et al. (2006). Neutrophil granule contents in the pathogenesis of lung injury. *Curr Opin Hematol* **13**: 21-7.
- Newton, K. and V. M. Dixit (2012). Signaling in innate immunity and inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **4**: 3.
- Nguyen, L. T., E. F. Haney, et al. (2011). The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends Biotechnol* **29**: 464-72.
- Nishimura, J., H. Saiga, et al. (2008). Potent antimycobacterial activity of mouse secretory leukocyte protease inhibitor. *J Immunol* **180**: 4032-9.
- Odaka, C., T. Mizuochi, et al. (2003). Murine macrophages produce secretory leukocyte protease inhibitor during clearance of apoptotic cells: implications for resolution of the inflammatory response. *J Immunol* **171**: 1507-14.
- Ossovskaya, V. S. and N. W. Bunnett (2004). Protease-activated receptors: contribution to physiology and disease. *Physiol Rev* **84**: 579-621.
- Rosanna, D. P. and C. Salvatore (2012). Reactive oxygen species, inflammation, and lung diseases. *Curr Pharm Des* **18**: 3889-900.
- Sallenave, J. M. (2010). Secretory leukocyte protease inhibitor and elafin/trappin-2: versatile mucosal antimicrobials and regulators of immunity. *Am J Respir Cell Mol Biol* **42**: 635-43.
- Sallenave, J. M. and S. Shapiro (2008). Proteases and antiproteases in development, homeostasis and disease: The old, the new, and the unknown. *Int J Biochem Cell Biol* **40**: 1066-7.
- Sallusto, F., C. E. Zielinski, et al. (2012). Human Th17 subsets. *Eur J Immunol* **42**: 2215-20.
- Salmi, M. and S. Jalkanen (2005). Cell-surface enzymes in control of leukocyte trafficking. *Nat Rev Immunol* **5**: 760-71.
- Salmi, M. and S. Jalkanen (2012). Ectoenzymes controlling leukocyte traffic. *Eur J Immunol* **42**: 284-92.
- Samsom, J. N., A. P. van der Marel, et al. (2007). Secretory leukoprotease inhibitor in mucosal lymph node dendritic cells regulates the threshold for mucosal tolerance. *J Immunol* **179**: 6588-95.
- Schneeberger, S., T. Hautz, et al. (2008). The effect of secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) on ischemia/reperfusion injury in cardiac transplantation. *Am J Transplant* **8**: 773-82.
- Schuster, S., B. Hurrell, et al. (2012). Crosstalk between neutrophils and dendritic cells: a context-dependent process. *J Leukoc Biol* in press.
- Shi, J., S. Aono, et al. (2007). A novel role for defensins in intestinal homeostasis: regulation of IL-1β secretion. *J Immunol* **179**: 1245-53.
- Sims, G. P., D. C. Rowe, et al. (2010). HMGB1 and RAGE in inflammation and cancer. *Annu Rev Immunol* **28**: 367-88.
- Smith, C. W. (2008). 3. Adhesion molecules and receptors. *J Allergy Clin Immunol* **121**: S375-9; quiz S414.
- Song, D. H. and J. O. Lee (2012). Sensing of microbial molecular patterns by Toll-like receptors. *Immunol Rev* **250**: 216-29.
- St John, A. L. and S. N. Abraham (2013). Innate immunity and its regulation by mast cells. *J Immunol*

nol **190**: 4458-63.
 Sutton, C. E., L. A. Mielke, et al. (2012). IL-17-producing gamma-delta T cells and innate lymphoid cells. *Eur J Immunol* **42**: 2221-31.
 Taggart, C. C., G. J. Lowe, et al. (2001). Cathepsin B, L, and S cleave and inactivate secretory leucoprotease inhibitor. *J Biol Chem* **276**: 33345-52.
 Wahl, S. M. (2007). Transforming growth factor-beta: innately bipolar. *Curr Opin Immunol* **19**: 55-62.
 Williams, M. R., V. Azcutia, et al. (2011). Emerging mechanisms of neutrophil recruitment across endothelium. *Trends Immunol* **32**: 461-9.
 Xu, W., B. He, et al. (2007). Epithelial cells trigger frontline immunoglobulin class switching through a pathway regulated by the inhibitor SLPI. *Nat Immunol* **8**: 294-303.

¡¡Oferta!!
 Pipetas y Artículos Plásticos



ThermoLabsystems



Nikon



ThermoSorvall



ThermoSorvall



ThermoForma

Para encontrar todas las soluciones en instrumental, no hace falta investigar.



Carlos Pellegrini 755 - Piso 9 - Ciudad Autónoma de Buenos Aires - Tel/Fax 4326 5205 - 4322 6341 - www.microlat.com.ar



Oferta promocional. Precios especiales de pipetas, artículos y rotors. Precios especiales hasta el 30/04/2013.

INSTRUCCIONES PARA LOS AUTORES

Revista CIENCIA E INVESTIGACION

Ciencia e Investigación, órgano de difusión de la Asociación Argentina para el Progreso de las Ciencias (AAPC), es una revista de divulgación científica y tecnológica destinada a educadores, estudiantes universitarios, profesionales y público en general. La temática abarcada por sus artículos es amplia y va desde temas básicos hasta bibliográficos: actividades desarrolladas por científicos y tecnólogos, entrevistas, historia de las ciencias, crónicas de actualidad, biografías, obituarios y comentarios bibliográficos. Desde el año 2009 la revista tiene difusión en versión on line (www.aargentinapciencias.org)

PRESENTACIÓN DEL MANUSCRITO

El artículo podrá presentarse vía correo electrónico, como documento adjunto, escrito con procesador de texto word (extensión «doc») en castellano, en hoja tamaño A4, a doble espacio, con márgenes de por lo menos 2,5 cm en cada lado, letra Time New Roman tamaño 12. Las páginas deben numerarse (arriba a la derecha) en forma corrida, incluyendo el texto, glosario, bibliografía y las leyendas de las figuras. Colocar las ilustraciones (figuras y tablas) al final en página sin numerar. Por tratarse de artículos de divulgación científica aconsejamos acompañar el trabajo con un glosario de los términos que puedan resultar desconocidos para los lectores no especialistas en el tema.

La primera página deberá contener: Título del trabajo, nombre de los autores, institución a la que pertenecen y lugar de trabajo, correo electrónico de uno solo de los autores (con asterisco en el nombre del autor a quién pertenece), al menos 3 palabras claves en castellano y su correspondiente traducción en inglés. La segunda página incluirá un resumen o referencia sobre el trabajo, en castellano y en inglés, con un máximo de 250 palabras para cada idioma. El texto del trabajo comenzará en la tercera página y finalizará con el posible glosario, la bibliografía y las leyendas de las figuras. La extensión de los artículos que traten temas básicos no excederá las 10.000 palabras, (incluyendo título, autores, resumen, glosario, bibliografía y leyendas). Otros artículos relacionados con actividades científicas, bibliografías, historia de la ciencia, crónicas o notas de actualidad, etc. no deberán excederse de 6.000 palabras.

El material gráfico se presentará como: a) figuras (dibujos e imágenes en formato JPG) y se numerarán correlativamente (Ej. Figura 1) y b) tablas numeradas en forma correlativa independiente de las figuras (Ej. Tabla 1). En el caso de las ilustraciones que no sean originales, éstas deberán citarse en la leyenda correspondiente (cita bibliográfica o de página web). En el texto del trabajo se indicará el lugar donde el autor ubica cada figura y cada tabla (poniendo en la parte media de un renglón Figura... o Tabla..., en negrita y tamaño de letra 14). Es importante que las figuras y cualquier tipo de ilustración sean de buena calidad. La lista de trabajos citados en el texto o lecturas recomendadas, deberá ordenarse alfabéticamente de acuerdo con el apellido del primer autor, seguido por las iniciales de los nombres, año de publicación entre paréntesis, título completo de la misma, título completo de la revista o libro donde fue publicado, volumen y página. Ej. Benin L.W., Hurste J.A., Eigenel P. (2008) The non Lineal Hypercycle. Nature 277, 108 – 115.

Se deberá acompañar con una carta dirigida al Director del Comité Editorial de la revista Ciencia e Investigación solicitando su posible publicación (conteniendo correo electrónico y teléfono) y remitirse a cualquiera de los siguientes miembros del Colegiado Directivo de la AAPC: abaladi@dna.uba.ar - nidiabasso@yahoo.com - miguelblesa@yahoo.es – xammar@argentina.com - sarce@cnea.gov.ar y con copia a secretaria@aargentinapciencias.org

Quienes recepcionen el trabajo acusarán recibo del mismo y lo elevarán al Comité Editorial. Todos los artículos serán arbitrados. Una vez aprobados para su publicación, la versión corregida (con las críticas y sugerencias de los árbitros) deberá ser nuevamente enviada por los autores.

