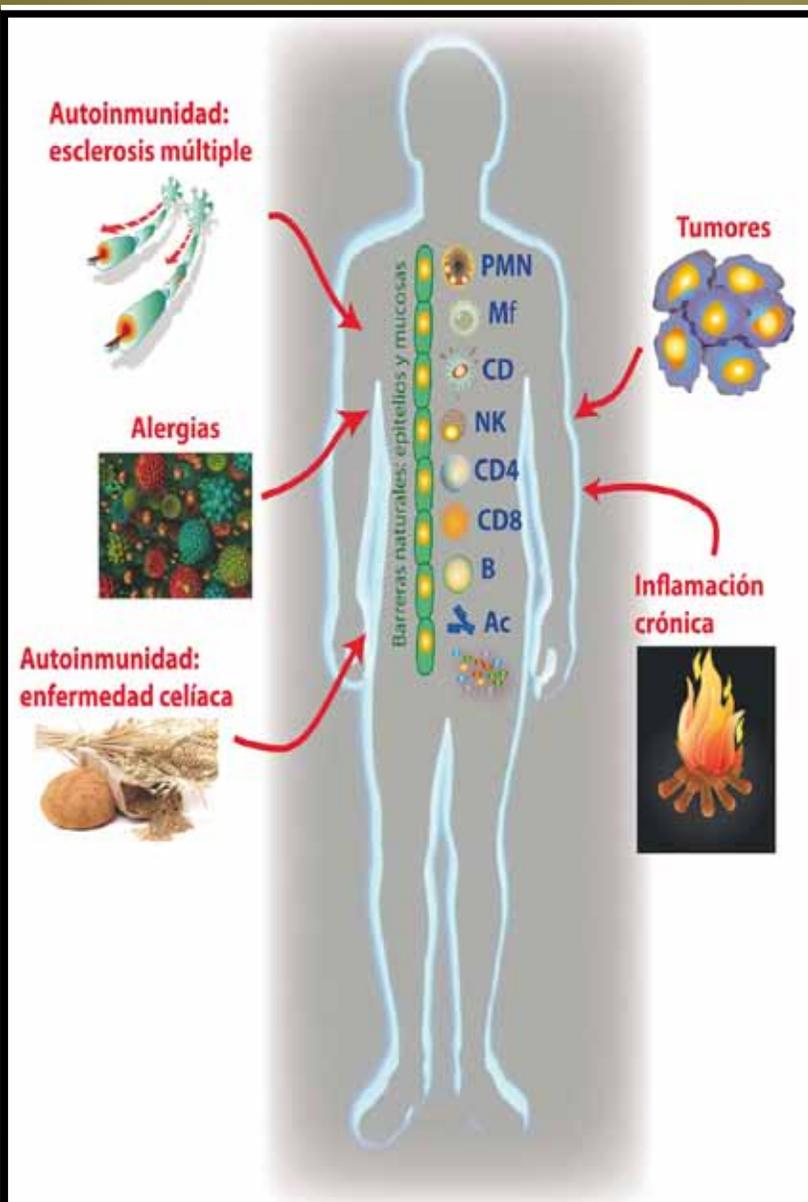


Ciencia e Investigación Divulgación

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

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.

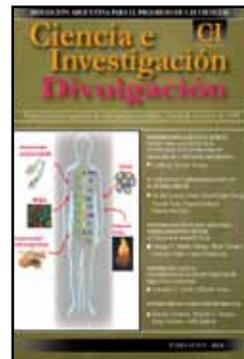
A partir de 2012 se publica en dos
series, Ciencia e Investigación
Divulgación y Ciencia e Investiga-
ción Reseñas.

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.aargentinpaciencias.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

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-

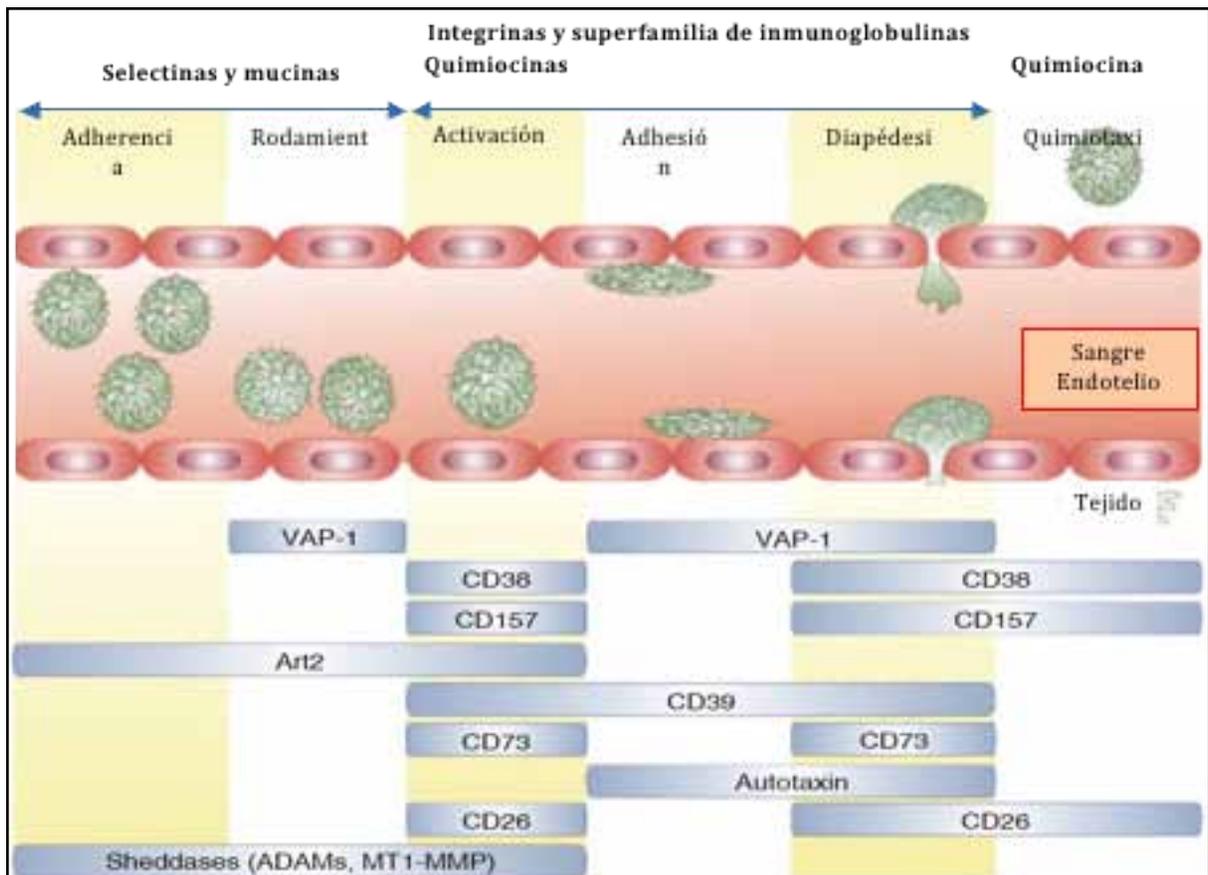


Figura 1. Cascada de adhesión y migración leucocitaria. Se muestran las etapas de cada una de las etapas de la cascada y las moléculas participantes en cada una de ellas. Por debajo se observan las ectoenzimas involucradas en la extravasación de leucocitos. (Figura adaptada de *Nat Rev Immunol* 5(10):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

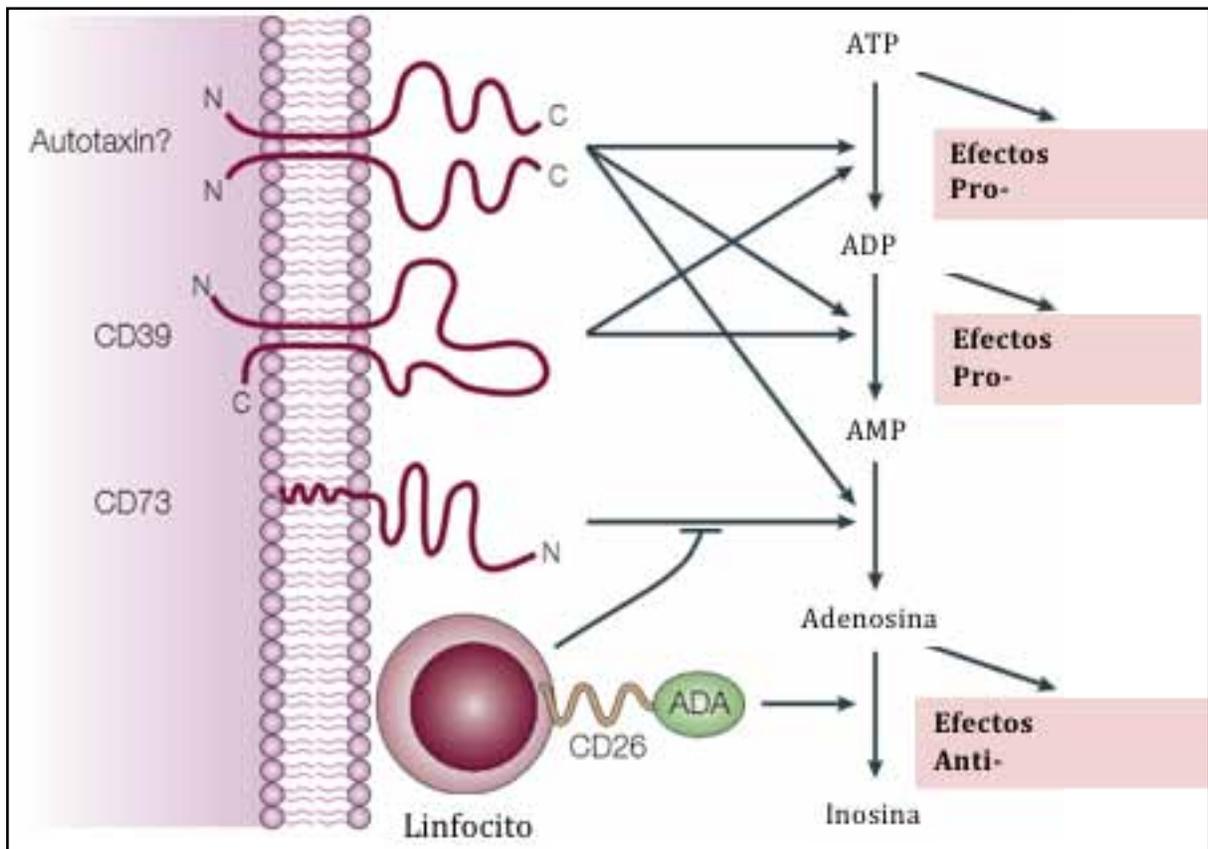


Figura 2. Metabolismo extracelular del ATP en el tráfico leucocitario. En un endotelio no activado, el ATP extracelular es defosforilado a ADP y a AMP por la ectoenzima CD39. El AMP es defosforilado a adenosina por CD73. El ATP ejerce efectos pro-inflamatorios al unirse a receptores purinérgicos de la 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).

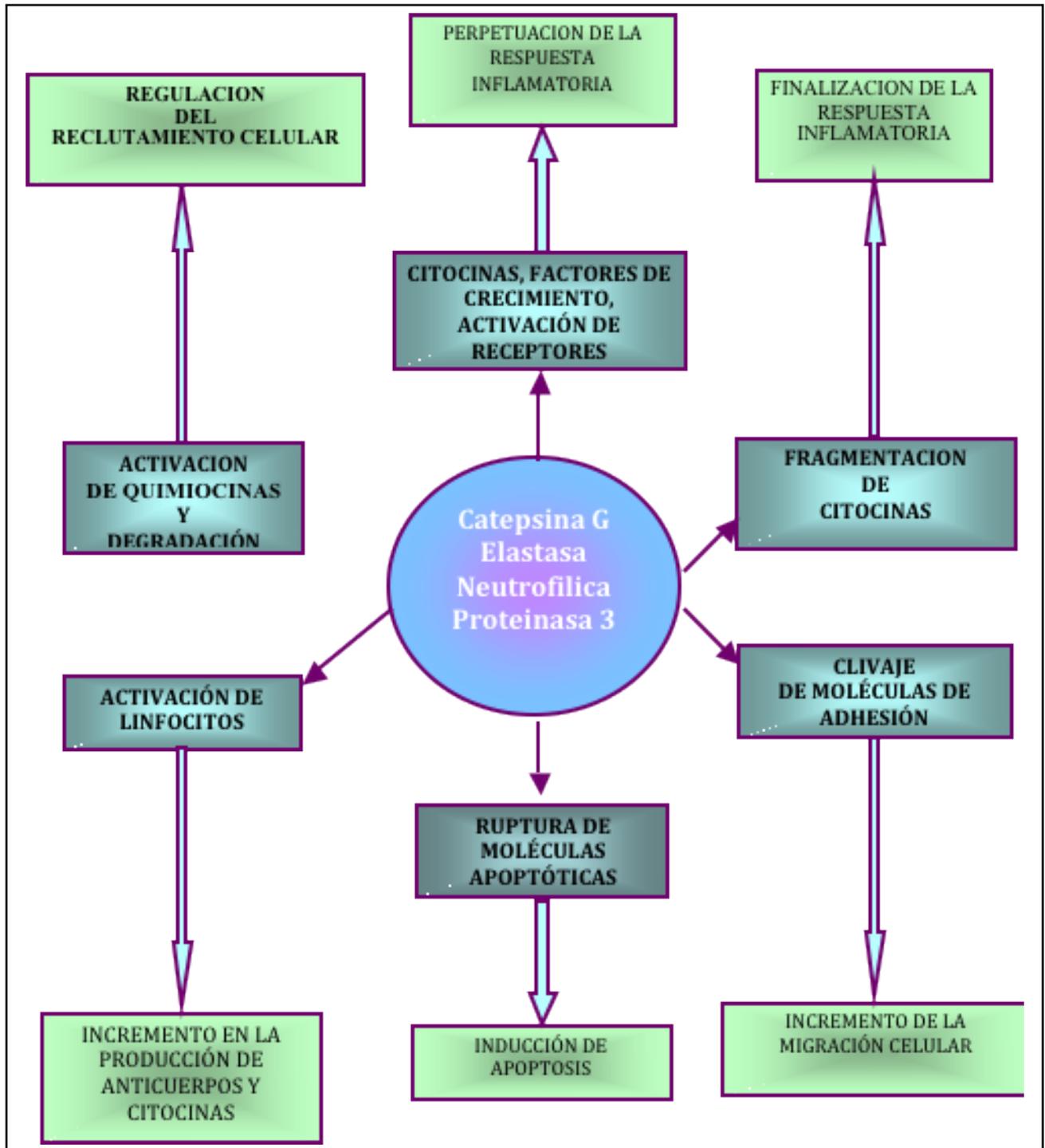


Figura 3. Proteasas Neutrofílicas La elastasa neutrofílica no es el único componente de los gránulos de los neutrófilos. También se encuentran otras serino-proteasas como la proteinasa 3 (PR3) y la catepsina G (CG). La figura muestra todas las funciones asociadas a las proteasas neutrofílicas.

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).

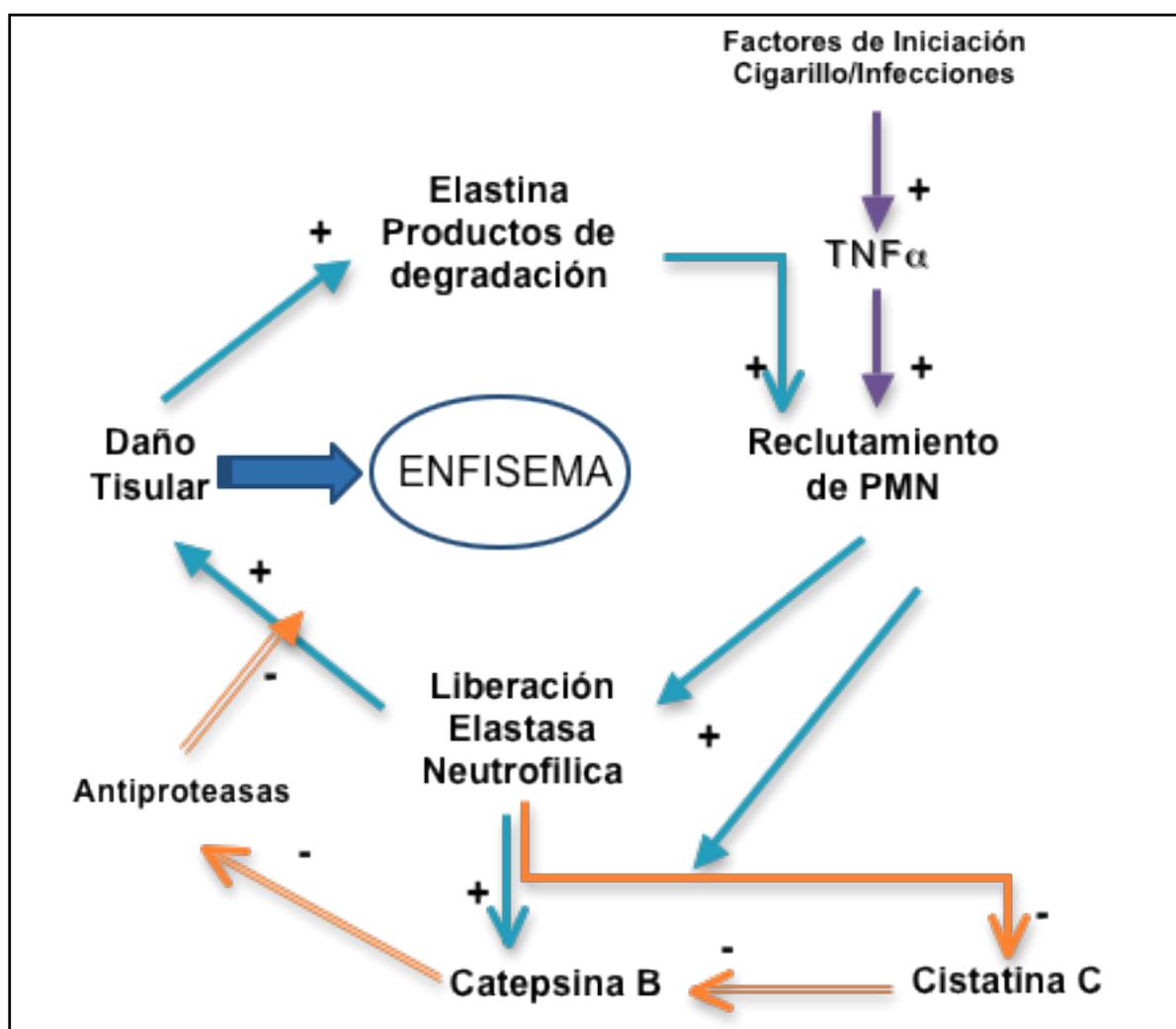


Figura 4. Patogenia del enfisema pulmonar. El cigarrillo o el humo del cigarrillo estimulan la producción de la citoquina TNF- α que activa el endotelio vascular aumentando la expresión de moléculas de adhesión y quimiocinas y reclutando neutrófilos. Los neutrófilos liberan elastasa, provocando la destrucción 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 cathepsina. En condiciones fisiológicas, la cathepsina 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 cathepsina. De esta manera, la elastasa junto a la cathepsina 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 cathepsina 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 interleucina-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 liberado 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 CDs 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 CDs 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

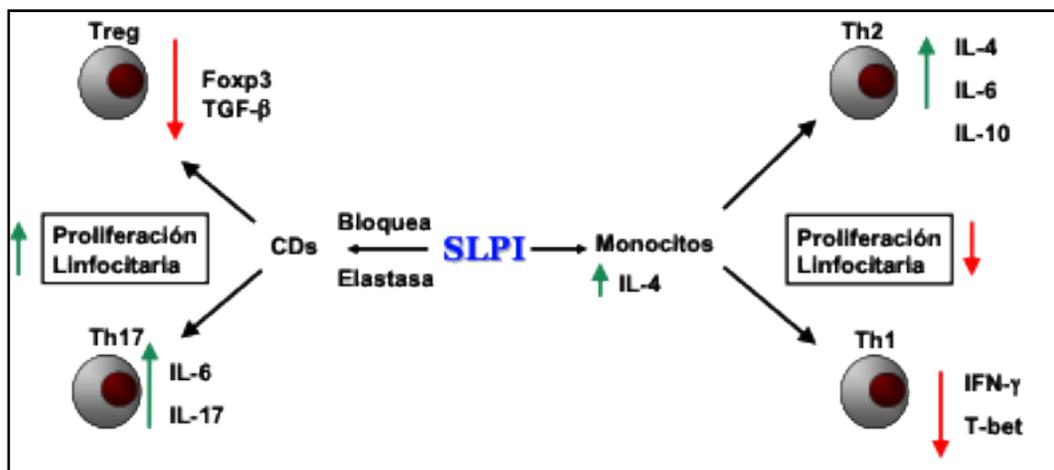


Figura 5 Rol del SLPI como inmunoregulador. El SLPI promueve la generación de CDs que aumentan los linfocitos Th17 y disminuyen la producción de linfocitos Treg. Además, actuando sobre monocitos bloquea la producción de linfocitos Th1 y aumenta la producción de citocinas del perfil Th2 *in vitro*.

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



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 plásticos y rotors de centrifugación 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.

