

**EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN DEL INHIBIDOR SECRETORIO DE  
PROTEASAS LEUCOCITARIAS EN EL CÁNCER DE PÁNCREAS Y SU  
VINCULACIÓN CON EL SISTEMA INMUNE**

Trabajo Final de Grado  
de la alumna



**Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales.  
Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires.**

Pergamino, 8 de marzo de 2021

**EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN DEL INHIBIDOR SECRETORIO DE  
PROTEASAS LEUCOCITARIAS EN EL CÁNCER DE PÁNCREAS Y SU  
VINCULACIÓN CON EL SISTEMA INMUNE**

Trabajo Final de Grado

de la alumna

**CARLA LUCERO REMOLINS**

Aprobada por el Tribunal Evaluador

Virginia Pasquinelli  
**Evaluadora**

Carlos Figueroa  
**Evaluador**

María Elena Sales  
**Evaluadora**

Eduardo Chuluyan  
**Director**

Diego Guerrieri  
**Co-Director**

Agustina Pascual  
**Tutora**

**Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales,  
Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires**

Pergamino, 8 de marzo de 2021

## AGRADECIMIENTOS

*Quisiera agradecer en primer lugar a mi director Eduardo, por permitirme ser partícipe de este proyecto, acompañarme sin imposiciones y con mucha paciencia. Gracias por todos sus conocimientos compartidos y la calidez humana.*

*A mi co-director, Diego, y a mi tutora, Agustina, por su compromiso y predisposición para que pueda concretar este trabajo de la manera más profesional posible.*

*A las/os profesoras/es de la UNNOBA, por formarme con tanta dedicación estos años y por transmitirme el amor por la genética y la ciencia.*

*A Juli G, Bren, Juli H, Juli P, Eri, Juli A, Manuel y a sus familias, por todo el cariño recibido, por brindar un espacio amoroso para compartir toda clase de sentimientos y proyectos y por hacer inolvidables estos años universitarios.*

*A Pablo, Yani, Belu, Cori, Nay, Beti, Karen y Leo por ser el grupo de apoyo de siempre, donde festejamos todo lo bueno y lloramos por lo malo, gracias por ser incondicionales.*

*A Carmen, Ángel y Juanito por abrirme las puertas de sus casas aún siendo una desconocida, gracias por cada comida, por cada charla, por prender una velita cada vez que rendía y por preocuparse por mi bienestar en todo momento.*

*A Noe, Julio y su familia, por hacerme partícipe de sus festejos como una integrante más, por su apoyo y comprensión, por tantas risas.*

*Finalmente, le agradezco de todo corazón a mi familia (madre, padre, hermanas, hermanos, cuñado, sobrina y sobrino), por sostenerme física y espiritualmente, inculcarme el pensamiento crítico, mimarme, preocuparse siempre de que no me falte nada, tenerme paciencia especialmente en este último tiempo, estar en cada detalle y brindarme su amor incondicional.*

*Escribe Eduardo Galeano en El libro de los abrazos: “El mundo es eso. Un montón de gente, un mar de fueguitos. Cada persona brilla con luz propia entre todas las demás. No hay dos fuegos iguales”. A cada persona que me acompañó en este trayecto le digo gracias por el fuego. ¡Jamás lo hubiese logrado sola!*

## ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS .....	I
ABREVIATURAS.....	IV
RESUMEN .....	VI
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
1.1. El páncreas .....	1
1.2. Generalidades del adenocarcinoma ductal pancreático.....	1
1.2.1. Terapias utilizadas en el ACDP .....	3
1.3. El sistema inmunológico .....	6
1.3.1. La función de las células dendríticas .....	8
1.3.2. El rol de los monocitos.....	11
1.3.3. Inmunología del cáncer pancreático .....	12
1.4. El inhibidor secretorio de proteasas leucocitarias .....	15
1.4.1. Características generales .....	15
1.4.2. SLPI y cáncer .....	17
<b>2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>23</b>
2.1. Hipótesis .....	23
2.2. Objetivo general.....	23
2.3. Objetivos específicos .....	23
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>24</b>
3.1. Pacientes .....	24
3.2. ELISA sándwich para SLPI .....	24
3.3. Obtención de SLPI recombinante humano .....	24
3.3.1. Diálisis de SLPI y elusión por Polimixina B.....	26
3.3.2. Actividad anti-serinoproteasa.....	26

3.3.3. Cuantificación de la concentración de proteína .....	27
3.4. Obtención de monocitos circulantes .....	28
3.5. Diferenciación de monocitos a CDs .....	29
3.6. Cultivo de líneas celulares de ACDP y cuantificación de SLPI .....	29
3.7. Co-cultivo de monocitos y células tumorales .....	29
3.8. Análisis estadístico.....	30
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>31</b>
4.1. Sección I: evaluación de la cuantificación de SLPI sérico.....	31
4.1.1. Análisis de los niveles plasmáticos de SLPI en los pacientes con ACDP.....	31
4.1.2. Asociación entre los niveles de SLPI y las características clínicas de los pacientes con ACDP .....	33
4.2. Sección II: estudios funcionales de SLPI sobre la respuesta inmune ....	35
4.2.1. Efecto de rhSLPI en la diferenciación de CDs derivadas de monocitos .....	35
4.2.2. Un modelo de estudio <i>in vitro</i> de la función de SLPI en el ACDP ....	37
<b>5. DISCUSIÓN .....</b>	<b>41</b>
<b>6. CONCLUSIÓN .....</b>	<b>46</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>47</b>

## ABREVIATURAS

ACDP	adenocarcinoma ductal pancreático
ANOVA	análisis de la variancia (del inglés <i>Analysis Of Variance</i> )
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BSA	albúmina sérica bovina (del inglés <i>Bovine Serum Albumin</i> )
CD	clúster de diferenciación
CDs	células dendríticas
CMH	complejo mayor de histocompatibilidad
CMSP	células mononucleares de sangre periférica
CPA	células presentadoras de antígeno
CSF1	factor estimulante de colonias 1 (del inglés <i>Colony-Stimulating Factor 1</i> )
DAMPs	patrones moleculares asociados a daño (del inglés <i>Damage-associated molecular patterns</i> )
DE	desvío estándar
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EGF	factor de crecimiento epidérmico (del inglés <i>Epidermal Growth Factor</i> )
EPB	extracto pituitario bovino
GM-CSF	factor estimulador de las colonias de granulocitos y macrófagos (del inglés <i>Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor</i> )
IL	interleucina
IMC	índice de masa corporal
IPTG	isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido
I- $\kappa$ B	inhibidor del factor nuclear kappa B
LB	medio de cultivo <i>Luria Broth</i>
LGALS3	gen de galectina-3
LPS	lipopolisacárido
MCP-1	proteína quimioattractante de monocitos 1 (del inglés <i>monocyte chemoattractant protein-1</i> )
M-CSF	factor estimulador de colonias de macrófagos (del inglés <i>Macrophage Colony Stimulating Factor</i> )

NF- $\kappa$ B	factor nuclear kappa B (del inglés <i>nuclear factor-kappa B</i> )
NK	células asesinas naturales (del inglés <i>Natural killer cells</i> )
PAMPs	patrones moleculares asociados a patógenos (del inglés <i>Pathogen-associated molecular patterns</i> )
PLA	ensayo de ligadura por proximidad (del inglés <i>proximity ligation assay</i> )
PVR	receptor del poliovirus (del inglés <i>poliovirus receptor</i> )
PVRL2	receptor relacionado con el poliovirus 2 (del inglés <i>poliovirus receptor-related 2</i> )
rhSLPI	SLPI recombinante humano
RRP	receptores de reconocimiento de patrones
SECTM1	proteína secretada y transmembrana 1 (del inglés <i>Secreted And Transmembrane 1</i> )
SLPI	inhibidor secretorio de proteasas leucocitarias (del inglés <i>secretory leukocyte peptidase inhibitor</i> )
TCR	receptor de células T (del inglés <i>T cell receptor</i> )
Tfh	linfocitos T colaboradores foliculares (del inglés, <i>T follicular helper</i> )
TGF- $\beta$	factor de crecimiento transformante beta (del inglés <i>transforming growth factor beta</i> )
Th	linfocitos T colaboradores (del inglés, <i>T helper</i> )
TNF $\alpha$	factor de necrosis tumoral alfa (del inglés <i>tumor necrosis factor-alpha</i> )
Treg	linfocitos T reguladores

## RESUMEN

La comprensión de la fisiopatología del cáncer de páncreas y de su variante más común, el adenocarcinoma ductal pancreático (ACDP), se torna urgente debido a un gran número de factores. Entre ellos se destacan la alta tasa de mortalidad, el pronosticado aumento en su incidencia, la falta de tratamientos eficaces y el fracaso de la inmunovigilancia tumoral. Este último, podría deberse a factores de evasión inmunitaria producidos en el microambiente tumoral por las células cancerosas. Por lo tanto, aquí evaluamos el papel de un inmunomodulador: el inhibidor secretorio de proteasas leucocitarias (SLPI) en el ACDP. Medimos su concentración en el suero de pacientes con cáncer de páncreas y de voluntarios sanos mediante la técnica de ELISA sándwich y observamos que un grupo de pacientes tenían niveles séricos muy superiores a los sanos. La mayoría de estos pacientes con concentraciones séricas altas poseían el tumor en la cabeza del páncreas, con estadio avanzado y sin posibilidad de resección por cirugía. También detectamos una correlación indirecta entre los niveles séricos de SLPI y el tiempo de recurrencia o progresión de la enfermedad.

Asimismo, en experimentos *in vitro*, utilizamos citometría de flujo para medir diversos marcadores de superficie celular y demostramos que SLPI, exógeno o producido por células tumorales pancreáticas, reguló negativamente la diferenciación de monocitos humanos en células dendríticas. Todos estos resultados sugieren que SLPI contribuye al microambiente inmunosupresor del cáncer de páncreas al actuar como un factor de evasión inmune del tumor. Además, la cuantificación de SLPI sérico puede ser una nueva herramienta que ayude a la toma de decisiones clínicas apropiadas. También, serviría como objetivo terapéutico en aquellos pacientes con cáncer de páncreas con niveles altos de SLPI.



## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. El páncreas

El páncreas humano es un órgano aplanado que mide cerca de 12,5 a 15 cm de largo, se localiza por detrás de la curvatura mayor del estómago, tiene una cabeza, un cuerpo y una cola y está conectado con el duodeno por medio de dos conductos. En cuanto a su fisiología, es tanto una glándula endocrina como exocrina, disponiéndose casi la totalidad de sus células en racimos llamados acinos. Los acinos exocrinos conforman más del 85 % del órgano y producen jugo pancreático, un líquido transparente e incoloro formado en su mayor parte por agua, algunas sales, bicarbonato de sodio y varias enzimas que desembocan en el tubo digestivo a través de una red de conductos. Dispersos entre éstos, y ocupando el 1-2 % de su volumen total, hay millones de pequeños racimos de tejido endocrino llamados islotes pancreáticos o islotes de Langerhans, que producen fundamentalmente cuatro hormonas: glucagón, insulina, somatostatina y el polipéptido pancreático<sup>(1)</sup>.

La acumulación de acinos exocrinos, que a menudo rodean a los islotes endócrinos, divide al páncreas en lóbulos que se encuentran definidos por una cápsula delgada de tejido conectivo, la cual se extiende hacia el parénquima en forma de tabiques o septos. Esta cápsula, junto con el tejido conectivo interlobular asociado, brinda sostén a los vasos sanguíneos y linfáticos, a los nervios, a los ganglios linfáticos y a los conductos pancreáticos. Dentro de este espacio, las arterias que irrigan el páncreas se dividen en arteriolas y se distribuyen a los lóbulos individuales<sup>(2)</sup>.

### 1.2. Generalidades del adenocarcinoma ductal pancreático

La Organización Mundial de la Salud define al cáncer como un término genérico, el cual incluye a un conjunto de enfermedades que comparten una característica distintiva: “la rápida multiplicación de células anormales que se extienden más allá de sus límites habituales y que pueden invadir partes adyacentes o propagarse a otros órganos”<sup>(3)</sup>. En el páncreas, los cánceres que lo afectan se clasifican según su perfil morfológico y de expresión de marcadores, que reflejan la célula o tejido que los originó. Es así como los

cánceres exocrinos y endocrinos representan las principales neoplasias epiteliales malignas en este órgano<sup>(4)</sup>. Los cánceres exocrinos o adenocarcinomas se dividen, además, en cánceres de células ductales – aquellas que revisten a los conductos pancreáticos y sus ramificaciones– y acinares –las encargadas de la excreción de los componentes del jugo pancreático–<sup>(5)</sup>.

En este contexto, el adenocarcinoma ductal pancreático (ACDP) representa la forma más común de cáncer de páncreas; por tal motivo, el término cáncer de páncreas se utiliza a menudo como sinónimo de ACDP en la literatura científica, así como en las redes sociales y medios de comunicación. Se trata de una enfermedad muy severa, con la mayor tasa de letalidad de todos los cánceres y una supervivencia a cinco años menor al 8 %<sup>(6)</sup>. Además, las proyecciones para el año 2030, en Europa y Estados Unidos, estiman un dramático incremento de las muertes totales por cáncer de páncreas (Figura 1), convirtiéndose así en la segunda causa principal de muertes relacionadas con el cáncer en la próxima década<sup>(7,8)</sup>. Actualmente, la Agencia Internacional de Investigación sobre Cáncer, reportó que la mortalidad por cáncer en Argentina representa la segunda causa de muerte, ocupando el cáncer de páncreas el cuarto lugar como el responsable del 6,7 % de las defunciones<sup>(9)</sup>.

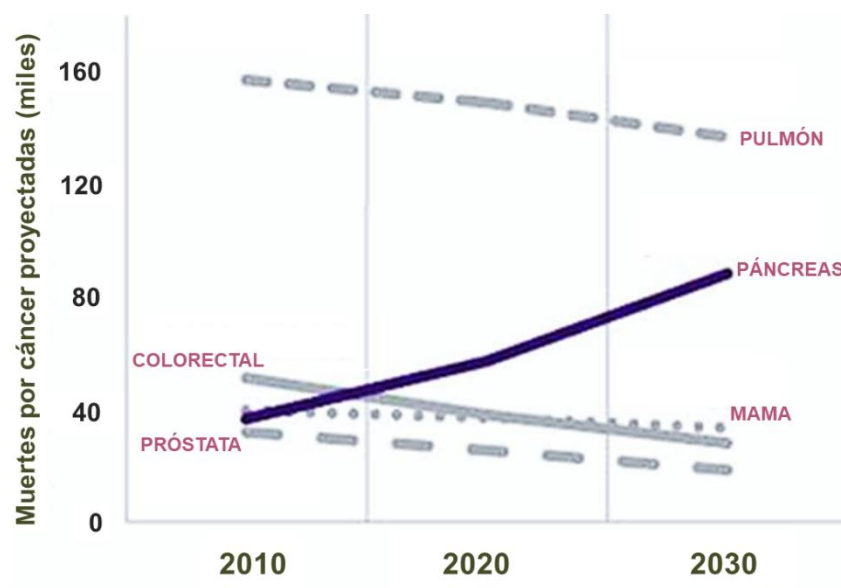


Figura 1: Proyección de las muertes por cáncer para el año 2030. Estimaciones del número de muertes por diversos tipos de cáncer basadas en cambios demográficos y en las tasas de mortalidad para cada cáncer. Adaptado de Rahib *et al.*, 2014<sup>(7)</sup>.

El ACDP se localiza con mayor frecuencia en la región de la cabeza del órgano, donde suele obstruir al conducto pancreático principal y/o a sus ramificaciones<sup>(4)</sup>. En el momento del diagnóstico, la gran mayoría de los tumores ya han crecido más allá de los límites anatómicos del órgano y han logrado la infiltración del tejido adiposo peri-pancreático o del duodeno –para el caso de localizaciones en la cabeza–, y del bazo, el mesocolon, el estómago o la glándula suprarrenal izquierda cuando se originan en el cuerpo o la cola del páncreas<sup>(10)</sup>. A esta situación de detección tardía contribuyen la ausencia de biomarcadores sensibles y la presencia de heterogeneidad biológica, generando que la única opción potencialmente curativa, la resección quirúrgica, sólo sea factible en el 10 al 20 % de los pacientes, es decir, aquellos que no presentan metástasis en los ganglios linfáticos regionales y/o enfermedad localmente avanzada<sup>(11,12)</sup>.

Macroscópicamente, el ACDP tiene el aspecto de una masa blanquecina mayoritariamente sólida con consistencia firme y contornos irregulares<sup>(4)</sup>, en el que más del 80 % corresponde al estroma, cuyo crecimiento o desmoplasia, es predictor del fenotipo agresivo del tumor<sup>(13,14)</sup>. Esto puede atribuirse a la barrera física que el estroma forma alrededor de las células tumorales, protegiéndolas de la vigilancia inmune y otorgándoles quimiorresistencia<sup>(15)</sup>. Con respecto a este último fenómeno, muy frecuente en el ACDP, se ha reportado que la capacidad de retención de agua de algunas proteínas de la matriz extracelular, como el colágeno y el ácido hialurónico, genera una presión de líquido intersticial que dificulta el suministro de fármacos a las células tumorales<sup>(16,17)</sup>. Además, el estroma desempeña un papel vital en la creación de un microambiente inmunosupresor, promoviendo la progresión de la enfermedad y la metástasis<sup>(18)</sup>, puesto que su desarrollo forma una barrera física alrededor de las células tumorales, protegiéndolas de la vigilancia inmunológica.

### 1.2.1. Terapias utilizadas en el ACDP

Como se mencionó anteriormente, la única opción potencialmente curativa del ACDP es la resección quirúrgica, pero ésta sólo es posible en el 10 al 20 % de los pacientes y, aun así, las tasas de recurrencia son muy altas<sup>(19)</sup>. Por lo tanto, el enfoque estándar para estos pacientes con enfermedad resecable –debido en gran parte a que el tumor se presenta con límites definidos y sin

compromiso vascular— es el tratamiento postoperatorio que evite la reincidencia<sup>(20)</sup>. En algunos pacientes el tumor se manifiesta con compromiso del sistema vascular o de estructuras locales pero con posibilidades de ser resecaos quirúrgicamente<sup>(21)</sup>. Sin embargo, en estos casos es posible que la resección sea incompleta, requiriendo un tratamiento preoperatorio que defina aún más los límites del tumor y facilite su resección. Desafortunadamente, la mediana de supervivencia cuando la resección del tumor es completa es de solo 28,7 meses y cuando es incompleta es de 17,2 meses<sup>(22)</sup>. Finalmente, la mayoría de los pacientes se diagnostican con la enfermedad localmente avanzada o metastásica, con una mediana de supervivencia de 6 a 11 meses para el primer caso, y entre 2 y 6 meses para el segundo<sup>(23)</sup>, por lo que, para estas personas, se recurre a una terapia paliativa que les genere un mejor pasar. Todos estos datos resaltan la urgente necesidad de desarrollar métodos de diagnóstico temprano y nuevas opciones terapéuticas.

Las altas tasas de recurrencia local y a distancia (en sitios de metástasis) han estimulado la búsqueda de tratamientos complementarios a la cirugía. En este contexto, la terapia preoperatoria es administrada antes del procedimiento quirúrgico, con el objetivo de reducir el estadio del tumor antes de la cirugía. La terapia postoperatoria se utiliza para eliminar aquellas células malignas que han perdurado en el organismo luego de haber sido extirpado el tumor, por lo que previene la recurrencia local en el lecho pancreático. Por último, la terapia paliativa o de inducción se utiliza para incitar una remisión, es decir, la desaparición de los signos y síntomas de cáncer sin modificar la supervivencia<sup>(24)</sup>. Para cada uno de estos tres tipos de enfoques, se utiliza la quimioterapia sistémica, la radioterapia o quimiorradioterapia. El beneficio de supervivencia de la quimioterapia es claro, pero el de la radioterapia sigue siendo discutido<sup>(24–26)</sup>. Los agentes quimioterapéuticos se basan principalmente en gemcitabina y fluoropirimidinas<sup>(27,28)</sup>, siendo el primero el más utilizado por su mayor tolerabilidad de efectos secundarios y por asociarse con un beneficio clínico significativo<sup>(29,30)</sup>. Se han propuesto nuevos fármacos para mejorar la supervivencia de los pacientes, como la combinación de Folfirinox y Nabpaclitaxel, pero los resultados no fueron prometedores y generaron mayor toxicidad<sup>(31,32)</sup>. Para la paliación de síntomas también son importantes la

descompresión biliar quirúrgica o radiológica, el alivio de la obstrucción de la salida gástrica, el control del dolor y la atención psicológica<sup>(33–35)</sup>. En la **Figura 2** se resumen los principales tratamientos a optar según la situación del paciente con cáncer pancreático. Se debe tener en cuenta que la terapia a escoger en cada caso se decide en una reunión multidisciplinaria, ya que el paciente debe poder tolerar la quimioterapia y/o la cirugía<sup>(35)</sup>.

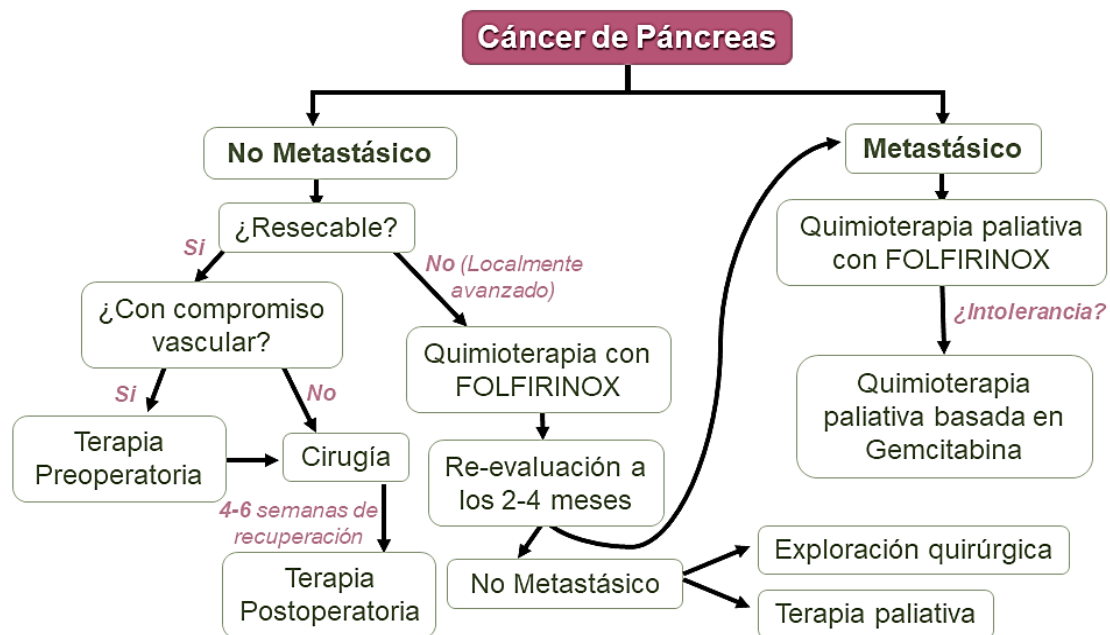


Figura 2: Diagrama de flujo para el tratamiento de pacientes con cáncer pancreático. Se presentan de manera simplificada las opciones de tratamiento a seguir en cada caso.

En los últimos años se ha desarrollado una nueva estrategia antitumoral basada en la inmunoterapia. Esta es una estrategia novedosa que se ha investigado en una variedad de cánceres con el fin de activar al sistema inmune (sorteando puntos de control inhibitorios) para que reconozca de manera específica y erradique las poblaciones de células tumorales<sup>(36)</sup>. En este contexto, para el cáncer de páncreas se han estudiado inhibidores de puntos de control inmunológicos de agente único y doble, así como combinaciones con quimioterapia citotóxica y radiación, entre otros, pero no han mostrado un beneficio clínico significativo<sup>(37)</sup>. Existen múltiples hipótesis sobre los mecanismos de resistencia del ACDP a la inmunoterapia, algunas de ellas incluyen la falta de células efectoras en el microambiente del tumor además de la existencia de un infiltrado inmunosupresor y del denso estroma que le impide el acceso a las células del sistema inmunitario<sup>(38)</sup>.

En síntesis, en la actualidad, los pacientes con cáncer de páncreas, tienen varias opciones de tratamientos<sup>(39)</sup> pero la tasa de supervivencia de la enfermedad pareciera ser inmutable. Las propuestas de nuevos agentes terapéuticos deben contemplar esta situación además de proporcionar una solución al problema del “impenetrable” estroma tumoral que, como se aclaró anteriormente, es una de las causas más importantes de la resistencia del tumor a cualquiera de los enfoques terapéuticos.

### 1.3. El sistema inmunológico

La capacidad de nuestro organismo de protegerse frente al ataque de agentes infecciosos, sustancias perjudiciales e incluso células tumorales está dada por nuestro sistema inmunitario, un conjunto muy diverso de células y moléculas efectoras. A grandes rasgos, clásicamente se mencionan dos tipos de respuestas inmunes: la innata y/o la adaptativa. La primera incluye mecanismos de defensa poco específicos presentes desde el nacimiento, entre los que se encuentran las barreras físicas y químicas de la piel y las mucosas -primera línea de defensa-, las sustancias antimicrobianas y un gran conjunto de células, en el que se reconocen a neutrófilos, basófilos, eosinófilos, mastocitos, células dendríticas (CDs), monocitos, macrófagos y células asesinas naturales (NK, del inglés *natural killer*) entre otras. La respuesta adaptativa abarca mecanismos relacionados con el reconocimiento específico de sustancias, patógenos, células infectadas o células tumorales y utiliza para ello linfocitos T y B. Se la conoce por ese nombre porque se adquiere durante el lapso de vida de un individuo como una adaptación a una situación particular. Además, en muchos casos, origina el fenómeno de memoria inmunitaria, que mantiene la inmunidad a largo plazo<sup>(40,41)</sup>.

Ante la presencia de una noxa, rápidamente se pone en marcha la respuesta inmune innata. En la mayoría de los casos, esta respuesta logra erradicarla, pero si no puede hacerlo, entonces intentará contenerla hasta que los mecanismos propios de la inmunidad adaptativa sean operativos, proceso que suele demorar alrededor de una semana. Por otro lado, las células que desencadenan esta respuesta innata son las encargadas de orientar el perfil de

la respuesta inmunitaria adaptativa, principalmente a través del accionar de las CD<sub>s</sub><sup>(41)</sup>.

Para la detección de microorganismos, la inmunidad innata utiliza receptores de reconocimiento de patrones (RRP), que reconocen a moléculas conservadas de microorganismos y sus productos (denominadas patrones moleculares asociados a patógenos o PAMPs), y también a moléculas endógenas que indican daño celular o tisular, llamadas patrones moleculares asociados a daño o DAMPs<sup>(42)</sup>. La estrategia utilizada por la inmunidad adaptativa es diferente, dado que, tanto linfocitos B como T, emplean un vasto repertorio de receptores que difieren en su especificidad y permiten responder a una gran variedad de situaciones patológicas con gran eficiencia<sup>(40)</sup>. Cabe destacar que este proceso de adquisición de receptores antigénicos específicos de los linfocitos T y B, ocurre durante la ontogenia T y B a través de un proceso de recombinación somática que no requiere la presencia previa del microorganismo<sup>(41)</sup>.

El desarrollo de la respuesta adaptativa *de novo* requiere que las CD<sub>s</sub> capten y procesen moléculas derivadas del agente microbiano para luego cargar los péptidos derivados de la digestión en las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH). Estos péptidos, en el contexto de las moléculas del CMH, serán presentados a los linfocitos T, quienes reconocerán a los mismos a través del complejo receptor T (TCR). En el caso en el que la presentación antigénica se dé en el contexto de las CMH de clase I, sólo podrán activar a los linfocitos T CD8; en cambio si la presentación se da en el contexto de las CMH de clase II, sólo podrán activar a los linfocitos T *helper* (Th) o colaboradores. Además, para que la activación de las células T sea eficiente es necesaria la presencia de moléculas coestimuladoras en la superficie de las CD<sub>s</sub>, como CD80 y CD86 que interactúan con CD28 presente en la superficie de los linfocitos T; y también de un microambiente de citocinas secretadas por las células presentadoras de antígenos (CPA) o por otros tipos celulares circundantes. De esta manera, para la activación sostenida en el tiempo de linfocitos T son necesarias tres señales: la señal de activación, dada por la interacción entre el TCR y el complejo del péptido antigénico-CMH de la superficie de las CD<sub>s</sub>; la segunda señal, dada por las moléculas coestimuladoras que sólo se expresan

en las CPA profesionales (CDs, macrófagos y linfocitos B); y, por último, la señal de diferenciación atribuida a las diferentes citocinas que inducirán la activación de las células Th en un perfil funcional particular<sup>(43)</sup>.

En cuanto a la activación de las células B, precisan reconocer a su antígeno en su conformación nativa, internalizarlo y presentarlo en el contexto del CMH de clase II a un tipo de célula T, los linfocitos Tfh (del inglés, *T follicular helper*). Estos linfocitos Tfh fueron diferenciados a partir de linfocitos Th vírgenes por acción de CDs que previamente tuvieron que haber procesado y presentado el mismo antígeno que el linfocito B. De esta manera, una vez diferenciados los linfocitos Th al perfil Tfh (en un microambiente de citocinas rico en interleucina [IL] 6 e IL-21), migrarán hacia el borde de la zona T-B en los ganglios linfáticos y colaborarán con la activación del linfocito B, para que éste se transforme en un plasmoblasto y luego en un plasmocito productor de anticuerpos. Esta colaboración B-T permitirá la producción de grandes cantidades de anticuerpos específicos contra ese antígeno<sup>(41)</sup>. Entonces, se puede destacar que la activación de las células T es necesaria para el desarrollo de la respuesta humoral adaptativa -o de anticuerpos- frente a una situación patológica específica.

Por lo tanto, existe un vínculo crucial entre la respuesta inmune innata y la adaptativa que está dado principalmente por la capacidad de presentar antígenos y activar linfocitos, proceso en el cual las CDs cumplen una función fundamental ya que son las únicas CPA profesionales capaces de inducir una respuesta inmune primaria.

### 1.3.1. La función de las células dendríticas

Las CDs son un tipo de célula fagocítica del sistema inmunitario que se encuentra en casi todos los tejidos y deben su nombre a las largas prolongaciones digitiformes de su membrana celular. Continuamente se hallan captando moléculas por medio de fagocitosis e ingieren grandes cantidades de medio extracelular mediante un proceso conocido como macropinocitosis. Además, son las únicas células capaces de activar a los linfocitos T vírgenes, y con ello poner en marcha la respuesta inmunitaria adaptativa primaria<sup>(43)</sup>.



El origen de las CD es muy variado, se producen continuamente a partir de las células madre hematopoyéticas de la médula ósea por vía tanto mieloide como linfoide<sup>(44–46)</sup>. Los precursores de CD humanas viajan en la sangre y, a partir de ellos, se reponen la reserva de CD en los tejidos periféricos<sup>(47–49)</sup>, a lo cual también contribuyen los monocitos circulantes especialmente durante los procesos inflamatorios<sup>(50,51)</sup>.

En cuanto a sus marcadores de superficie, no expresan CD3 (marcador de células T), CD14 (marcador de monocitos y macrófagos), CD19 y CD20 (marcadores de linfocitos B) ni CD56 (marcador de células NK). Desde el punto de vista fenotípico y funcional se pueden clasificar en dos grandes subpoblaciones: las CD convencionales y las plasmocitoides. Las primeras expresan CD11c, pero no CD123, y su función es la de activar a los linfocitos T vírgenes y orientar el curso de la inmunidad adaptativa. Por el contrario, las CD plasmocitoides expresan CD123, pero no CD11c, y cumplen un papel importante en la fase aguda de las infecciones virales al producir cantidades masivas de interferones de tipo I<sup>(41)</sup>. En este trabajo, cuando se mencionan las CD se hace alusión a las de tipo convencional.

En una situación normal, las CD fagocitan las moléculas del medio y, a través de diferentes receptores, extraen las características del entorno que están censando. Si este se torna peligroso, entonces aumentan la tasa de migración hacia los ganglios linfáticos más cercanos, donde presentan antígenos a los linfocitos T que, si son capaces de reconocerlos, se activarán, expandirán y diferenciarán a células efectoras de la respuesta inmunitaria adaptativa. Durante este proceso de migración desde la periferia hasta los ganglios linfáticos regionales es posible reconocer diferentes estados funcionales en las CD que van desde la inmadurez hasta un estado completamente maduro. Las CD inmaduras se caracterizan por la expresión de un amplio repertorio de receptores RRP, de citocinas y de quemoquinas, y por su alta capacidad endocítica y de procesamiento antigénico; es decir, se encuentran censando continuamente el microambiente circundante y procesando de manera proteolítica los péptidos endocitados. Además, poseen una baja capacidad de presentar antígenos a los linfocitos T vírgenes, debido a que expresan en sus membranas bajos niveles de las moléculas de clase I y II del CMH y de moléculas coestimuladoras. La

activación de las CD4s mediada por sus diversos receptores induce una serie de cambios conocidos como “maduración” de las CD4s. Este proceso se asocia, en primer lugar, con la disminución de E-cadherina, que las mantiene ancladas al sitio, y el incremento del receptor de quemoquinas CCR7, que dirige la migración de las CD4s a los ganglios linfáticos. Luego se da la inhibición de la capacidad endocítica de las CD4s para restringir el repertorio de antígenos a presentar. También se incrementa la expresión de las moléculas coestimuladoras y CMH de clase I y II, y finalmente se produce un conjunto particular de citocinas que determinará el perfil de diferenciación de las células efectoras de la respuesta inmune adaptativa<sup>(40,41)</sup>. En la **Tabla 1** se resumen las principales funciones y marcadores expresados en cada tipo de CD4s.

<b>Característica</b>	<b>CD4s inmaduras</b>	<b>CD4s maduras</b>
<i>CD11c (marcador de CD4s convencionales)</i>	☑	☑
<i>Capacidad endocítica</i>	☑	☒
<i>Capacidad de procesamiento antigénico</i>	☑	☒
<i>CMH I y II (Capacidad de presentación antigénica)</i>	☒	☑
<i>CD80 y CD86 (moléculas coestimuladoras)</i>	☒	☑
<i>E-cadherina (anclaje en tejidos periféricos)</i>	☑	☒
<i>CCR7 (migración a ganglio linfático)</i>	☒	☑
<i>CD83 (marcador de CD4s maduras)</i>	☒	☑

Tabla 1: Características fenotípicas y fisiológicas de las células dendríticas inmaduras y maduras. Se mencionan los principales rasgos que determinan el estado de las CD4s. Las ☑ representan alta expresión o capacidad, mientras que las ☒ indican baja o nula expresión o capacidad.

En resumen, las CD4s son células especializadas en iniciar las respuestas inmunes adaptativas efectivas frente a una situación patológica, dado que, además de tener la capacidad de presentar antígenos, "interpretan" las propiedades de su microentorno según el conjunto particular de RRP que se activen en ellas.

### 1.3.2. El rol de los monocitos

Los monocitos son un tipo de leucocito mononuclear circulante muy importante en la respuesta inmunitaria, que se encuentran en la sangre y el bazo, aunque su mayor reservorio es la médula ósea<sup>(52)</sup>. Aumentan en condiciones inflamatorias como la aterosclerosis<sup>(53)</sup> y el cáncer<sup>(54)</sup> y participan en la homeostasis del cuerpo debido a que su capacidad fagocítica les permite remover células apoptóticas y otras sustancias tóxicas<sup>(55)</sup>.

Por otro lado, los monocitos también pueden vincular la inflamación y la respuesta innata con las respuestas inmunes adaptativas. De hecho, la función más conocida de estas células es la de actuar como un importante reservorio sistémico de precursores mieloides para la renovación de algunos macrófagos y CDs tisulares<sup>(50)</sup>, aunque esta renovación no dependa exclusivamente de los monocitos sanguíneos<sup>(56,57)</sup>. Cabe destacar que los macrófagos son células de vida media larga de gran plasticidad, dotadas de una alta capacidad fagocítica y microbicida, dado que expresan diversos receptores que reconocen PAMPs, opsoninas, citocinas y quemoquinas<sup>(41)</sup>. También es importante tener en cuenta que existe una población de células macrofágicas, denominados macrófagos tisulares, presentes en diferentes órganos y sistemas, que derivan de los progenitores embrionarios y tienen capacidad de auto-renovación local; es decir que no provienen de los monocitos circulantes.

En circunstancias normales, los monocitos y otros leucocitos fluyen por el centro de vasos sanguíneos de pequeño calibre, donde el flujo de sangre es más rápido. En un contexto patológico, los vasos se dilatan y el flujo sanguíneo más lento permite que los leucocitos salgan del centro del vaso e interactúen con el endotelio vascular para así abandonar el torrente sanguíneo -proceso conocido como extravasación- y migrar al tejido inflamado. Cabe destacar que, incluso en ausencia de infección, los monocitos migran de manera continua hacia los tejidos. Durante una respuesta inflamatoria, la inducción de moléculas de adhesión sobre las células endoteliales activadas por la noxa, así como cambios inducidos en las moléculas de adhesión expresadas sobre leucocitos, reclutan grandes números de leucocitos circulantes, al principio neutrófilos y más tarde monocitos, hacia el sitio de inflamación. Básicamente, primero interactúan con

las moléculas de adhesión de las células endoteliales de la pared del vaso sanguíneo, lo que permite la adherencia a las mismas, y luego, reciben señales de las quemoquinas unidas a este endotelio para que el monocito migre a través del endotelio hacia el tejido subyacente. Allí, dependiendo de las señales que reciban desde el ambiente, se diferenciarán a macrófagos o a CD4 y continuarán migrando bajo la influencia de las quemoquinas liberadas durante la respuesta inflamatoria. Por ejemplo, *in vitro* se ha demostrado que el factor estimulador de las colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF, del inglés *Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor*) es una citocina que junto con la IL-4 inducen la diferenciación del monocito hacia CD4, mientras que el factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF, del inglés *Macrophage Colony Stimulating Factor*) es una citocina que induce la diferenciación hacia macrófagos<sup>(43)</sup>.

Los monocitos humanos se caracterizan por la expresión de CD14 y CD16 y, según los niveles de expresión de éstos, es posible distinguir tres subpoblaciones: los clásicos, los intermedios y los no clásicos<sup>(58)</sup>. Además, no expresan marcadores de células T (CD3) ni de células B (CD19 y CD20), por lo que, para distinguirlos correctamente se puede analizar la presencia de un tercer marcador, como el CMH de tipo II ya que no se expresa en células NK o neutrófilos<sup>(59)</sup>.

En resumen, los monocitos cumplen funciones fagocíticas muy importantes en sangre periférica, mientras que cuando se extravasan a los tejidos pueden articular la respuesta inmune con la adaptativa, si se diferencian a CD4, o contribuir con el desarrollo de la inflamación, si se induce su diferenciación a macrófagos.

### 1.3.3. Inmunología del cáncer pancreático

La respuesta inmunitaria del huésped frente a un tumor sólido se ve representada por las células inmunes que logran infiltrarlo. Los diferentes tipos de células inmunitarias infiltrantes ejercen diversos efectos sobre la progresión del tumor, que pueden variar según el tipo de cáncer y, por lo tanto, afectar el pronóstico de los pacientes que lo padecen. Esta variedad en los efectos se debe a que el sistema inmunitario establece un diálogo dinámico con el tumor que le

permite modificar sus propiedades fenotípicas y funcionales. En la mayoría de los casos, resulta en la aparición de variantes tumorales poco inmunogénicas, las cuales facilitan el crecimiento tumoral al impedir el reconocimiento inmunitario<sup>(41)</sup>. Así es como se distingue una función dual del sistema inmunitario: por un lado, reprimiendo la aparición de las células transformadas o incluso eliminándolas y por el otro esculpiendo los fenotipos tumorales al ejercer una fuerza de selección sobre los clones menos inmunogénicos; lo que permitió proponer la Teoría de la inmunoedición de los tumores<sup>(60)</sup>.

Se reconocen tres etapas en el proceso de inmunoedición tumoral: la eliminación, el equilibrio y el escape. En la fase de eliminación las células tumorales son efectivamente reconocidas –por la producción de alarminas y neoantígenos que llevan a una respuesta inflamatoria local– y eliminadas por el sistema inmunitario, esto último a través de mecanismos citotóxicos mediados por perforinas y granzimas y por el sistema Fas/Fas ligando. En la eliminación participan diferentes componentes de la respuesta innata y adaptativa como los macrófagos, las células NK, linfocitos T CD4<sup>+</sup> –principalmente los del perfil Th1– y T CD8<sup>+</sup> citotóxicos y la citoquina interferón gamma, entre otros. Los clones que no fueron eliminados proceden a una fase de equilibrio o de “latencia” tumoral, en la que los tumores y el sistema inmunitario se encuentran en un equilibrio dinámico que mantiene controlada la expansión tumoral y la activación linfocitaria, seleccionando a las variantes tumorales menos inmunogénicas. Finalmente, los tumores que ya no son susceptibles al reconocimiento y ataque inmunitario entran en la fase de escape, la cual suele coincidir con la aparición de manifestaciones clínicas asociadas al crecimiento y la progresión tumoral<sup>(41)</sup>.

En cuanto al microambiente tumoral del ACDP, se encontró que los tipos de células inmunes infiltrantes detectadas en muestras de pacientes se correlacionaban con la supervivencia de los mismos. Por ejemplo, se asociaron con una mayor supervivencia los niveles altos de macrófagos diferenciados en un perfil proinflamatorio (M1) y de linfocitos T (CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>), y los bajos de células T regulatorias (Treg) y macrófagos M2 (perfil antiinflamatorio)<sup>(61)</sup>. Cabe destacar que igualmente, en la mayoría de los pacientes con cáncer de páncreas –en contraste con otros tipos de tumores sólidos–, las células T efectoras

intratumorales son escasas, mientras que existe una invasión masiva de leucocitos inmunosupresores en el microambiente tumoral<sup>(61,62)</sup>.

Como se mencionó en secciones anteriores, la presencia de CD8 en el foco patológico (en este caso el tumor) es esencial para generar una respuesta inmune específica y efectiva, hecho que debería asociarse a un mejor pronóstico en los pacientes. En cáncer de páncreas, se ha demostrado esta correlación con el buen pronóstico, pero también que las CD8 se encuentran en bajas cantidades en el microambiente tumoral y que a menudo lo hacen en su forma inmadura, lo que estaría limitando su capacidad de presentar antígenos tumorales a las células T<sup>(63–65)</sup>. Además, recientemente, Hegde *et al.*<sup>(66)</sup> encontraron que la ausencia o disfunción de CD8 en el ACDP puede magnificar respuestas improductivas de células T, es decir que se diferencian mayoritariamente en un perfil Th17 en lugar del perfil Th1 (que sería funcional para combatir el tumor); y que la migración de CD8 mejora la actividad de las células T CD8<sup>+</sup> y Th1 para reducir el crecimiento tumoral y aumentar la respuesta a la radioterapia, además de reducir la deposición de colágeno –factor muy importante para romper la barrera del estroma tumoral–.

En cuanto a los monocitos, se vio que aumentan en la sangre y disminuyen en la médula ósea de los pacientes con cáncer de páncreas y que esto se asocia con una menor supervivencia luego de la resección del tumor<sup>(67)</sup>. También se ha encontrado que, en ACDP, se diferencian a células inmunosupresoras o incluso fibroblastos. Por ejemplo, se observó que, en algunos pacientes, la actividad inmunosupresora de un subconjunto de células supresoras derivadas de la línea mieloide se limitó a un subconjunto de origen monocítico<sup>(68)</sup>. Por otro lado, en un modelo de ACDP *in vitro*, se demostró que el estrés oxidativo induce la transdiferenciación a miofibroblastos promoviendo así la fibrosis y la progresión tumoral y obstaculizando la respuesta inmune<sup>(69)</sup>.

Resulta evidente que, en simultáneo a las etapas descritas en la Teoría de la inmuoedición, se da una respuesta inmunosupresora desde el tumor que también modifica fenotípicamente la respuesta inmunitaria e incluso la “aprovecha” para su beneficio. Por lo tanto, para desarrollar una estrategia que mejore la respuesta inmune contra el ACDP y que se traduzca en un resultado

clínico prometedor, se deben centrar los esfuerzos en comprender el papel del estroma y su interacción con el microambiente inmunitario para así aumentar la densidad de las células T efectoras intratumorales.

#### 1.4. El inhibidor secretorio de proteasas leucocitarias

##### 1.4.1. Características generales

El inhibidor secretorio de proteasas leucocitarias (SLPI, del inglés *secretory leukocyte peptidase inhibitor*) es un polipéptido altamente catiónico de 11,7 kDa, estable a los ácidos, no glucosilado y compuesto por 132 aminoácidos<sup>(70)</sup>. Su nombre se debe a la capacidad de inhibir serino proteasas, incluidas la elastasa y la catepsina G de los neutrófilos humanos, la quimasa y triptasa derivadas de los mastocitos así como la tripsina y quimotripsina pancreáticas<sup>(70–72)</sup>, enzimas que degradan proteínas mediante un aminoácido de serina en su centro activo. Este inhibidor puede detectarse constitutivamente en el suero y en los fluidos extravasculares de las mucosas y es producido por células epiteliales y algunas células inmunes<sup>(73,74)</sup>. Sin embargo, es posible encontrar SLPI en el citoplasma y en el núcleo de las células que no lo producen, como las CD4 y las células B, ya que SLPI extracelular puede atravesar la membrana celular<sup>(75,76)</sup>. Además de su actividad antiproteasa –esencial para proteger los tejidos de la actividad proteolítica en los sitios de inflamación–, se han descrito para SLPI actividades pleiotrópicas como microbicida, de cicatrización de heridas, antiinflamatorias y tolerogénicas<sup>(77,78)</sup>.

El gen humano de SLPI se encuentra ubicado en el cromosoma 20q12-13.2, consta de cuatro exones y tres intrones que abarcan aproximadamente 2,6 kb<sup>(79,80)</sup> y parece no ser polimórfico en su región codificante<sup>(73)</sup>. La expresión de SLPI está modulada por diversos estímulos, que incluyen el lipopolisacárido (LPS), la elastasa de los neutrófilos y citocinas tanto proinflamatorias como antiinflamatorias<sup>(81–86)</sup>, que se resumen en la **Tabla 2**. No se ha detectado un estado de deficiencia de SLPI en humanos, sin embargo, los ratones nulos para el gen de SLPI mostraron un deterioro en la cicatrización de heridas cutáneas. Este fenómeno se atribuyó a la actividad inhibidora de SLPI sobre la elastasa neutrofílica local, que evita la degradación de algunas de las proteínas de la matriz extracelular, como el colágeno, los proteoglicanos y la fibronectina<sup>(87)</sup>.

Además, SLPI puede controlar la activación e inflamación excesiva de leucocitos y la alta actividad del factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ , por sus siglas en inglés) y del factor de necrosis tumoral alfa o TNF $\alpha$ <sup>(87,88)</sup>. Otro objetivo de SLPI es el crecimiento celular, dada la regulación positiva y negativa que ejerce sobre genes asociados con el crecimiento, como ciclina D1 y TGF- $\beta$ , respectivamente; además de evitar la escisión proteolítica de factores de crecimiento<sup>(88,89)</sup>.

<b>Regulador</b>	<b>Actividad</b>	<b>Tipo de regulación sobre SLPI</b>
LPS	Componente mayoritario de la membrana externa de las bacterias Gram negativas	Positiva <sup>(81)</sup>
Elastasa de neutrófilos	Proteasa de fibras elásticas localizada en los gránulos primarios de los leucocitos polimorfonucleares	Positiva <sup>(82)</sup>
IL-1 $\beta$	Citoquina proinflamatoria implicada en la activación de macrófagos y extravasación leucocitaria, entre otras funciones	Positiva <sup>(83)</sup>
TNF- $\alpha$	Citoquina pleiotrópica proinflamatoria	Positiva <sup>(83)</sup>
$\alpha$ -defensinas	Péptidos antimicrobianos	Positiva <sup>(84)</sup>
Interferón- $\gamma$	Citoquina pleiotrópica proinflamatoria	Negativa <sup>(85)</sup>
TGF- $\beta$	Citoquina pleiotrópica antiinflamatoria	Negativa <sup>(86)</sup>

Tabla 2: Reguladores de la expresión de SLPI. Se describen los reguladores positivos y negativos más significativos de la expresión de SLPI y sus principales funciones.

La actividad antiinflamatoria de SLPI también está mediada a través de la protección de I- $\kappa$  $\beta$ , el inhibidor del factor nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B, por sus siglas en inglés), un elemento de transcripción que regula genes que promueven la supervivencia celular, la infiltración, la quimiorresistencia y la formación de vasos sanguíneos. Al inhibir la activación de la vía NF- $\kappa$ B, SLPI incapacita a los macrófagos para liberar citoquinas proinflamatorias y óxido nítrico<sup>(75,90)</sup>.

Sobre el rol de SLPI en la respuesta inmune adaptativa existe consistente evidencia que sugiere que SLPI podría tener características tolerogénicas<sup>(91,92)</sup>. Se sabe que las CDs son los actores clave en la inducción de respuestas inmunes eficaces o tolerogénicas, y que una respuesta inmune eficiente, como la que se desearía en los pacientes con ACDP, requiere la presencia y la función adecuada de las CDs. Llamativamente, se observó que las CDs en los ganglios



linfáticos cervicales, pero no en los periféricos, expresan SLPI<sup>(93)</sup>. Se ha postulado que la función de SLPI en las CDs en el ganglio linfático de drenaje de las mucosas es controlar la secreción de citocinas y evitar el aumento de moléculas coestimuladoras inducido por productos microbianos. Esto está respaldado, en el mismo trabajo, por experimentos realizados con ratones a los que se les ha silenciado el gen de SLPI, en donde la administración nasal de antígenos aumentó la expresión de las moléculas coestimuladoras y secretó niveles mayores de IL-12, IL-6 y de la proteína quimioattractante de monocitos 1 (MCP-1, por sus siglas en inglés) que los ratones que producen SLPI. Además, quienes llevaron a cabo la investigación muestran que, en ausencia de SLPI, hubo una pérdida de tolerancia a los antígenos cuando se administraron junto con LPS. Por lo tanto, se propuso que la expresión de SLPI por CDs actúa como un reóstato que controla el inicio y la intensidad de la respuesta inmunológica. Esto concuerda con la observación de que los ratones deficientes en SLPI muestran una inmunidad adaptativa mejorada<sup>(94)</sup>.

Recapitulando, el rol de SLPI no se limita a su función antiproteasa sino que varios estudios sugieren funciones antiinflamatorias y tolerogénicas en diversos contextos. En la siguiente sección se detallarán diferentes hallazgos sobre las funciones que este polipéptido desempeña en algunos tipos de tumores sólidos.

#### 1.4.2. SLPI y cáncer

Numerosas publicaciones, realizadas a partir de estudios en humanos, han mostrado que la expresión del SLPI se encuentra modulada en el cáncer. Se ha observado aumento o disminución de la expresión de esta proteína dependiendo del tipo de tumor. La medición del nivel sérico de SLPI mostró ser significativamente más elevado en pacientes con carcinomas de pulmón, ovario y gástrico que en los controles sanos, transformándolo en un nuevo biomarcador pronóstico de estas patologías<sup>(95-97)</sup>. También, en muestras de tejido de cáncer colorectal se ha observado una correlación entre los altos niveles de expresión de SLPI con la progresión y la severidad de la enfermedad<sup>(98,99)</sup>. Por el contrario, se expresa débilmente en carcinoma nasofaríngeo<sup>(100)</sup>, tumores de vejiga y algunos carcinomas mamarios<sup>(101)</sup>. A su vez, la sobre-expresión de esta proteína

se correlaciona con formas más invasivas y metastásicas de diferentes tumores, como por ejemplo cierto tipo de carcinoma de mama<sup>(102)</sup> y el cáncer de ovario<sup>(97)</sup>. También, en los pacientes con cáncer de páncreas se ha demostrado que SLPI aumenta en el plasma<sup>(103)</sup> y que su caída inhibe la proliferación, migración e invasión de distintas líneas celulares tumorales de ACDP<sup>(104)</sup>, lo que sugiere que SLPI está asociado con la progresión tumoral en el páncreas.

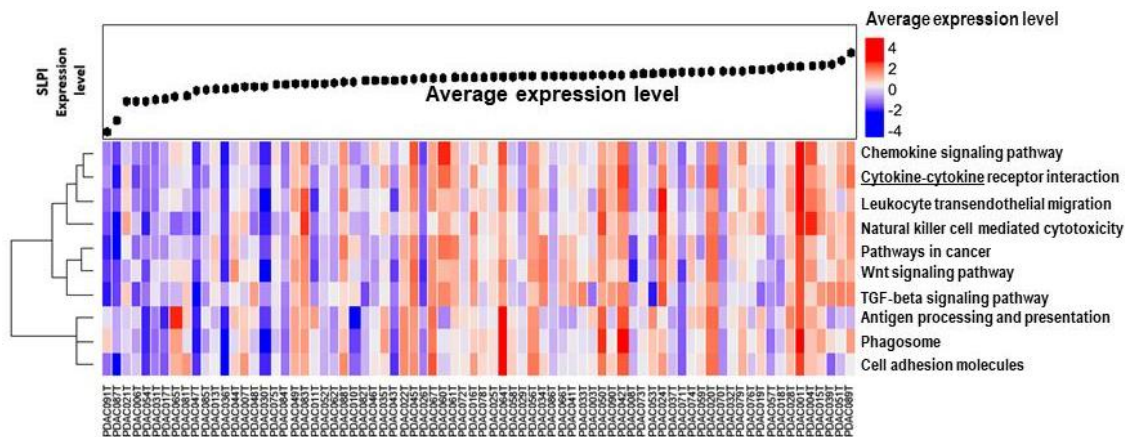
Respecto a sus efectos sobre otras líneas tumorales, se han observado acciones opuestas. Por ejemplo, la expresión de SLPI en dos líneas tumorales de ovario (OVCAR-3 y SKOV-3) disminuye la proliferación celular<sup>(105)</sup>, mientras que mostró tener capacidad de estimular la proliferación de células del endometrio humano y porcino, razón por la cual podría actuar como un factor que favorece la transformación neoplásica<sup>(106)</sup>. En células de carcinoma pulmonar, SLPI aumenta la tumorigenicidad y el potencial metastásico siendo estos fenómenos dependientes de su actividad anti-elastasa<sup>(107)</sup>.

La progresión del tumor generalmente se asocia con una extensa remodelación tisular para proporcionar un entorno adecuado para el crecimiento tumoral, la angiogénesis, la invasión y la metástasis de las células cancerosas<sup>(108)</sup>. De hecho, debido a su capacidad para activar y liberar citocinas y factores de crecimiento y para degradar componentes de la matriz extracelular, las proteasas son necesarias para proporcionar condiciones óptimas para el crecimiento y la invasión de células cancerosas y endoteliales. La expresión de los correspondientes inhibidores de proteasas en tumores es una forma de controlar la actividad de estas enzimas y, por tanto, se espera que sean antimalignos<sup>(109)</sup>. Sin embargo, como se detalló anteriormente, en varios tumores el aumento en los niveles de SLPI se asocia a un aumento de la malignidad tumoral. Aún no se conocen con certeza los mecanismos por los cuales SLPI facilitaría la progresión del tumor, pero esto evidencia la necesidad de no limitar la función de SLPI a su actividad antiproteasa sino de resaltar su característica pleiotropía. Así es como algunas publicaciones sugieren que podrían estar involucrados mecanismos que favorecerían la angiogénesis<sup>(110)</sup>; otras en cambio, que la ausencia o inhibición de la función anti-proteasa de SLPI podría promover la diseminación del tumor por permitir la degradación del tejido circundante por parte de las proteasas secretadas por las células malignas<sup>(111)</sup>.

Por otro lado, basándose en las funciones de inmunomodulador de SLPI, se ha planteado que la expresión de la proteína le proporciona a los tumores un mecanismo para evadir la infiltración por las células del sistema inmune<sup>(112)</sup>, además de ejercer una inmunosupresión generalizada al actuar como inhibidor de NF- $\kappa$ B<sup>(113)</sup>.

A pesar de estas evidencias que sugieren un efecto protumoral del SLPI, en trabajos previos en nuestro laboratorio se informó sobre una actividad antitumoral de SLPI en tumores mamarios pero no así en tumores de colon. Los mecanismos que subyacen a esta actividad antitumoral del SLPI eran mediados por un efecto sobre la apoptosis, ya que cultivos de líneas celulares de tumor mamario tratados con SLPI eran más propensos a la apoptosis que la línea control. *In vivo*, la administración de clones de células tumorales mamarias murinas capaces de sobre-expresar SLPI, no desarrollaban tumores en sus huéspedes. De esta manera, se propuso a SLPI como una nueva herramienta terapéutica para ciertos tumores de mama<sup>(114)</sup>.

Asimismo, estudiamos la relación de SLPI con los tumores de páncreas utilizando una estrategia diferente a la de los trabajos en cáncer de mama. Estos resultados recientes -aún no publicados- sobre el análisis bioinformático del transcriptoma de xenoinjertos de ACDP humanos evidenciaron una asociación entre la expresión del ARNm de SLPI con genes vinculados al tumor y a la respuesta inmune (Figura 3). Además, el análisis del secretoma de 38 líneas celulares primarias obtenidas de pacientes con ACDP (Figura 4) mostró una asociación entre la expresión proteica de SLPI con proteínas vinculadas a mecanismos de evasión de la respuesta inmune antitumoral (100 proteínas relacionadas con la migración y la invasión y ciertas funciones inmunológicas). Esto evidenció una fuerte asociación entre SLPI, M-CSF y Galectina-3 (molécula importante para las adhesiones célula-célula y célula-matriz, la activación de macrófagos, angiogénesis, metástasis, entre otras). Teniendo en cuenta que CSF-1 y la Galectina-3 deterioran la diferenciación de las CDs, sería posible hipotetizar que éste podría ser un nuevo mecanismo de evasión de la respuesta antitumoral en el cáncer de páncreas.



**Figura 3:** Asociación entre la expresión del ARNm de SLPI en adenocarcinoma pancreático con genes vinculados al tumor y a la respuesta inmune. Representación del mapa de calor del transcriptoma obtenido a partir de xenoinjertos de adenocarcinomas pancreáticos humanos. La secuenciación del ARN se realizó en 76 xenoinjertos de ACDP. Los recuentos de genes se normalizaron y se calculó el análisis de componentes independientes (ICA) utilizando el algoritmo JADE en el conjunto de datos de referencia (Pacaomics). ICA proporciona una descomposición de la matriz de expresión  $X = A \cdot S$ , siendo "A" la matriz de mezcla que contiene la influencia de los componentes en las muestras y "S", la contribución de cada gen a los componentes. En este estudio, el ICA descompuso el transcriptoma en 3 componentes y focalizamos el estudio en el componente que mejor se correlaciona con el gen de SLPI. Finalmente, realizamos un análisis de enriquecimiento del conjunto de genes sobre la contribución del gen al componente ICA seleccionado utilizando el paquete fGSEA. Se observa una asociación entre la expresión de SLPI con 3 grupos principales de genes funcionales involucrados en: i) las vías inmunológicas (de señalización de quimiocinas, interacción citocina-receptor de citocinas, migración transendotelial de leucocitos y vías de citotoxicidad mediadas por células NK); ii) las vías en cáncer (de señalización de Wnt y TGF- $\beta$ ); y iii) las vías de procesamiento y presentación antigénica.

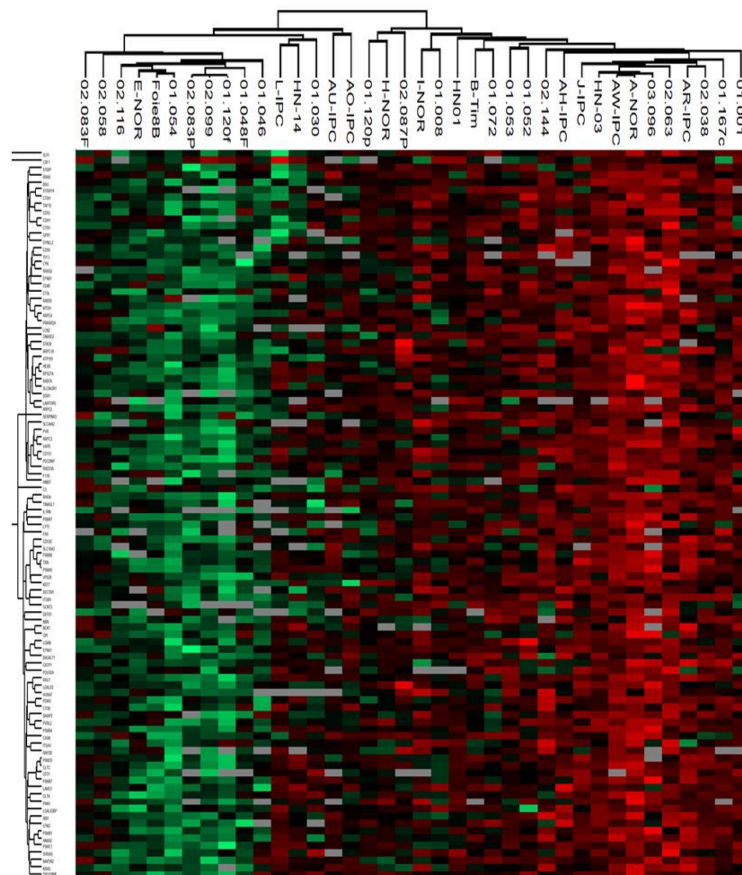


Figura 4: Asociación entre la expresión proteica de SLPI con proteínas vinculadas a mecanismos de evasión de la respuesta inmune antitumoral. Se amplificaron 38 líneas celulares y se obtuvo el medio de cada línea celular, los cuales fueron concentrados y analizados en una plataforma proteómica para su análisis por LC-MS/MS (cromatografía líquida y espectrometría de masas doble tándem). Los resultados de la plataforma proteómica, que incluyen todas las proteínas identificadas asociadas con la intensidad máxima de cada muestra (cuantificación relativa), se analizaron utilizando el programa Perseus para realizar agrupaciones, con el fin de identificar patrones de proteínas específicos. La imagen muestra todas las proteínas asociadas con SLPI (valor  $q < 0.03$ ) involucradas en la respuesta inmune y la migración de acuerdo con la ontología genética y el proceso biológico. Se reconocen factores que relacionados con mecanismos de evasión inmune tumoral, como con monocitos/macrófagos y función y fenotipo de células dendríticas (CSF1, SECTM1 y LGALS3), factores antiinflamatorios (IL1RN) y moléculas reguladoras del complemento (CD59, CD55, CD46) y de la actividad de células NK y CD8+ (Fas, PVR, PVRL2). La agrupación se realizó con el protocolo de similitud de coseno.

En síntesis, actualmente existen controversias sobre el posible rol que SLPI cumpliría en los procesos tumorales, dada su dualidad en la actividad pro o antitumoral. Por lo tanto, estos datos sugieren que no es posible generalizar

los hallazgos relacionados con la expresión y función de SLPI solo en un tipo único de cáncer, ya que su expresión y modulación parece ser específica del tumor. Por lo tanto, es de gran importancia determinar cuál es su efecto directo en el ambiente tumoral pancreático, es decir, tanto en las células tumorales como en las células y mediadores de la respuesta inmunológica (especialmente las CD4); ya que esta molécula parecería ser un factor relevante en el mecanismo de evasión de la respuesta inmune antitumoral en el páncreas y, por lo tanto, un blanco terapéutico prometedor para el desarrollo de una inmunoterapia para pacientes con ACDP.

## 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### 2.1. Hipótesis

Los pacientes con cáncer de páncreas tienen niveles elevados de SLPI y que dicha molécula altera la diferenciación de monocitos humanos en CDs.

### 2.2. Objetivo general

Cuantificar SLPI y examinar su función en el cáncer de páncreas, tanto como indicador de características clínicas como sobre la respuesta inmune.

### 2.3. Objetivos específicos

1. Determinar SLPI en el plasma de pacientes con cáncer de páncreas a través de un ensayo de ELISA sándwich.
2. Correlacionar los valores de SLPI con datos clínicos de progresión tumoral.
3. Purificar SLPI recombinante humano (rhSLPI) a partir de bacterias *E. coli*.
4. Diferenciar los monocitos humanos de sangre periférica a CDs con IL-4 + GM-CSF en presencia o no de rhSLPI.
5. Analizar y cuantificar la producción de SLPI por diferentes líneas celulares de ACDP.
6. Examinar el efecto de la co-incubación de líneas tumorales pancreáticas productoras o no de SLPI sobre la diferenciación de monocitos a CDs.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Pacientes

Los pacientes de los que se obtuvieron las muestras de plasma se agrupan bajo el ensayo clínico del Instituto Paoli-Calmettes (Marseille, Francia), identificador ClinicalTrials.gov: NCT01692873. Cabe destacar que esta parte del proyecto se realizó de manera colaborativa con el Dr. Juan Iovanna perteneciente al instituto mencionado anteriormente. Los formularios de consentimiento informado de cada paciente se recopilaron y registraron en una base de datos central. Las características demográficas y clínicas de los pacientes se registraron en una base de datos y se muestran en la [Tabla 3](#) (ver sección 4.1.1).

#### 3.2. ELISA sándwich para SLPI

Se utilizó el suero almacenado a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  de 44 pacientes con cáncer de páncreas y de 26 de adultos sanos. Estos sueros, obtenidos durante el período 2014-2017 y almacenados en Francia, fueron enviados a nuestro laboratorio para realizar las determinaciones. El SLPI sérico se determinó mediante ELISA tipo sándwich siguiendo las instrucciones del fabricante (R&D, Minneapolis, EE. UU.). La absorbancia se leyó en un lector de placas (Rayto, China) a 450 nm con una resta de 630 nm.

#### 3.3. Obtención de SLPI recombinante humano

Se utilizaron bacterias *E. coli* BL21-Codon Plus-RIL (*Stratagene*) productoras de rhSLPI, generadas en nuestro laboratorio y almacenadas a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Las mismas poseen un vector de expresión pET22b+ (*Novagen*). Este plásmido tiene el promotor Lac (inducible por isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido, IPTG) y 6 histidinas añadidas en el extremo C-terminal para la etapa de purificación.

A partir de estas bacterias se obtuvo un precultivo inoculando 7,5 ml de medio LB (*Luria Broth*) estéril con ampicilina (100  $\mu\text{g/ml}$ ) y cloranfenicol (50  $\mu\text{g/ml}$ ). El mismo se incubó durante toda una noche con agitación constante a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Al día siguiente, 500 ml de medio LB con ampicilina (100  $\mu\text{g/ml}$ ) y



cloranfenicol (50 µg/ml) se inoculó con 5 ml del precultivo anterior. Éste se dejó crecer a una temperatura de 37 °C con agitación constante hasta alcanzar una densidad óptica de 0,6 medida a 600 nm. Alcanzado este valor, se indujo la expresión de SLPI mediante el agregado IPTG (isopropiltiogalactósido) a una concentración final de 1 mM. La inducción se mantuvo durante 3 h a una temperatura de 28 °C con agitación constante. Luego, el cultivo se centrifugó a 7000 rpm durante 7 min (centrifuga tipo *Sorvall* ST16, con rotor de ángulo fijo y tubos cónicos de 50 ml) y el pellet se fraccionó y se almacenó a -20 °C para su posterior purificación.

Los *pellets* se resuspendieron en 2 ml de *buffer* de lisis (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, NaCl 1 M, Imidazol 10 mM; pH 8) y se agregó lisozima hasta llegar a una concentración final de 1 mg/ml. También se incorporó DNAsa y RNAsa a una concentración final de 10 µg/ml. Se dejó actuar a estas enzimas durante 30 min. Finalmente, las bacterias fueron lisadas por ultrasonido con 7 pulsos de 60 Watts de 30 seg de duración en un sonicador. Todo el procedimiento se realizó en hielo para evitar la proteólisis. Luego, el lisado se centrifugó a 10.000 g durante 30 min a una temperatura de 4 °C. La fracción soluble se recuperó y se adicionó a 800 µl de resina de Niquel-ácido nitrilotriacético (Ni-NTA), previamente equilibrada en *buffer* de lisis, y se incubó durante 1 h a 4 °C. Durante este tiempo se produjo la unión de la cola de 6 histidinas de SLPI al Ni<sup>+2</sup> inmovilizado de la resina. Posteriormente, se realizaron dos lavados de 15 ml con “*buffer* de lavado 20” (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, NaCl 1M e Imidazol 20 mM, pH 8); luego otros dos lavados con 15 ml de “*buffer* de lavado 40” (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, NaCl 1M e Imidazol 40 mM, pH 8); y por último dos lavados de 5 ml con “*buffer* lavado 75” (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, NaCl 1 M e Imidazol 75 mM, pH 8). Finalmente, SLPI fue eluido de la resina por el agregado de 2 ml de la solución “elusión 250” (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, NaCl 300 mM, Imidazol 250 mM, pH 8). La elusión se repitió tres veces para obtener el mayor rendimiento posible.

Para determinar la pureza de rhSLPI se realizó una electroforesis en gel de acrilamida (15%) en condiciones desnaturalizantes para las muestras obtenidas en la purificación de SLPI. Cada una de las muestras correspondientes a los diferentes pasos de la expresión y purificación se trataron con *buffer* de siembra (0,5% SDS, 1,5% glicerol) y β-mercaptoetanol. Las proteínas se

desnaturalizaron por calor (95 °C, 5 min). La corrida se realizó a 100 V durante 20 min aproximadamente y luego el gel se tiñó con *Coomasie-blue* durante 30 min. Las bandas se observaron realizando sucesivos lavados con una solución al 7% de ácido acético. Finalmente, se digitalizó una foto del gel para su posterior análisis con el programa ImageJ v1.52a. El rhSLPI así obtenido se encontró en una solución 250 mM de Imidazol. Finalmente, con el objeto de disminuir la concentración de imidazol, las muestras se dializaron en un *buffer* fosfato conteniendo 2,5 mM de imidazol (ver más abajo).

### 3.3.1. Diálisis de SLPI y elusión por Polimixina B

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

### 3.3.2. Actividad anti-serinoproteasa

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

### 3.3.3. Cuantificación de la concentración de proteína

Se construyó una curva de calibración con diluciones seriadas de albúmina sérica bovina (BSA, 0-250 µg/ml) en *buffer* “elusión 250” o en *buffer* de diálisis. En microplacas de 96 pozos (fondo plano), se colocaron 50 µl de las diluciones de BSA y las distintas muestras de SLPI. Luego se agregaron 50 µl de la solución obtenida con 50 partes del reactivo A, 48 partes de B y 2 partes de C del Kit de MicroBCA (*Pierce*, USA). La placa se incubó durante 1 h a 37 °C después de lo cual se leyó a 550 nm en el lector de ELISA. Se graficó una curva de concentración en función de la densidad óptica. Finalmente, se obtuvo el valor de la concentración de SLPI calculando la pendiente y la ordenada de origen de la curva como  $[SLPI] = (DO_{550} \text{ nm de SLPI-B})/\text{pendiente}$ . Como producto final de las distintas purificaciones realizadas se obtuvo SLPI en concentraciones que variaron entre 40 y 200 µg/ml diluidas en *buffer* 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 2,5 mM Imidazol y pH de 7,6. El SLPI generado tuvo la capacidad para inhibir la acción de la tripsina en los ensayos de actividad inhibitoria. En la **Figura 5** se presenta un diagrama de flujo de la producción de rhSLPI y los análisis que se realizan previo a su utilización en los experimentos.

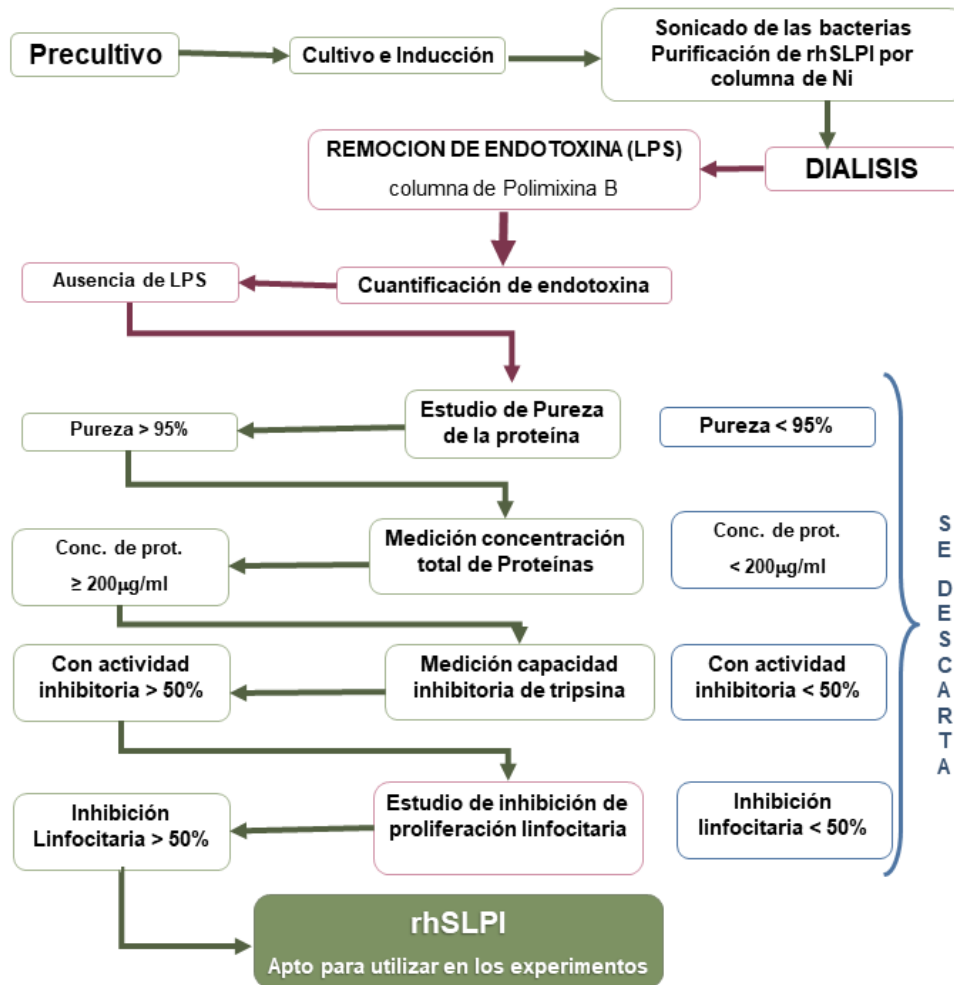


Figura 5: Diagrama de flujo de la producción de rhSLPI. Se indican los principales pasos y análisis que se realizan en la obtención de rhSLPI.

### 3.4. Obtención de monocitos circulantes

Se obtuvieron leucocitos de sangre periférica humana a partir de 10 “*buffy coats*” donadas por el servicio de hemoterapia del Hospital Churrúca (CABA). Por un gradiente de Ficoll-hypaque, se aislaron las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) y, utilizando partículas magnéticas (dynabeads, *ThermoFisher*) conjugadas a anticuerpos monoclonales para CD3, CD19 y CD56, se realizó la selección negativa de los monocitos circulantes. La pureza de la población de monocitos se determinó por citometría de flujo, midiendo la expresión en la membrana de CD14 utilizando un anticuerpo monoclonal marcado con fluorocromo (FITC o PE). El citómetro de flujo fue un Accuri C6Plus y la fluorescencia se estudió utilizando el programa FlowJo™ v7.6.2.

### 3.5. Diferenciación de monocitos a CDs

Obtenidos los monocitos, como se detalló previamente, se resuspendieron en RPMI 1640 (Gibco, *Grand Island*, NY, USA) suplementado con L-glutamina (2 ng/ml), gentamicina (40 µg/ml), GM-CSF (800 U/ml), IL-4 (500 U/ml) y 10% de suero bovino fetal (Gibco, *Grand Island*, NY, USA) inactivado en presencia y ausencia de SLPI (0.4-4 µg/ml). Se cultivaron aproximadamente  $20 \times 10^6$  células en placas de Petri de 100 x 20 mm durante 5 días en estufa a 37 °C y 5 % CO<sub>2</sub>. La diferenciación de los monocitos a CDs fue confirmada mediante inmunomarcaciones para CD14 (característico de monocitos y ausente en CDs), moléculas coestimuladoras (CD86) y CMH de clase I y II; las que fueron analizadas por citometría de flujo. El citómetro de flujo y el programa para analizar la fluorescencia fue el mismo que el detallado en la sección anterior.

### 3.6. Cultivo de líneas celulares de ACDP y cuantificación de SLPI

Se utilizaron dos líneas celulares de adenocarcinoma pancreático: MIA PaCa-2 y BxPC-3, obtenidas de la ATCC (*American Type Culture Collection*). Las células se cultivaron en DMEM/F-12 suplementado con 1,22 mg/ml de nicotinamida, 5 mg/ml de glucosa, 5% de ITS<sup>+</sup>, 100 µg/ml de gentamicina, 5% de Nu-suero IV, 25 µg/ml de extracto pituitario bovino (EPB), 20 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico (EGF), T3 50 nM, dexametasona 1 µM y 100 ng/ml de toxina de cólera; y se incubaron a 37 °C en una incubadora (gaseada, *Binder*) de CO<sub>2</sub> al 5%. La producción de SLPI se analizó utilizando un ensayo de ELISA sándwich de acuerdo con las condiciones del fabricante, en los medios condicionados de las células MIA PaCa-2 y BxPC-3. Los medios condicionados se generaron incubando las células ( $10^4$ /pocillo) en presencia o ausencia de suero bovino fetal por 24 h en las condiciones descritas más arriba. Una vez cosechados los medios, estos fueron centrifugados (1200 rpm, 10 min), e inmediatamente almacenados en alícuotas a -70 °C, hasta realizar el ensayo de ELISA sándwich. La absorbancia se leyó en un lector de placas a 450 nm.

### 3.7. Co-cultivo de monocitos y células tumorales

Los monocitos fueron puestos a diferenciar a CDs en presencia de IL-4 y GM-CSF, tal como se detalló anteriormente, y fueron colocados en la parte superior de un *Transwell* (separados por filtros de policarbonato de 0,4 mm) en

tanto que en la parte inferior se cultivaron las líneas celulares tumorales pancreáticas productoras o no de SLPI. El ensayo de diferenciación de monocitos a CDs se realizó a 37°C durante 5 días. Finalizado el período de incubación, se recuperaron las células de la parte superior del *Transwell* y se estudió CD14, la molécula de superficie característica de los monocitos. Las inmunomarcaciones fueron analizadas por citometría de flujo, utilizando un citómetro Accuri C6Plus y anticuerpos conjugados al fluorocromo PE. En todos los casos se utilizaron controles de isotipo. Es importante señalar que con este ensayo no se intentaron estudiar en profundidad las características de las CDs sino tener un prueba simple y rápida que permita evaluar, en un futuro, la acción inhibitoria de SLPI en la diferenciación de monocitos a CDs.

### 3.8. Análisis estadístico

Todos los datos se expresan como media  $\pm$  desviación estándar o mediana (rango intercuartílico) como se indica en cada figura o tabla. Las diferencias estadísticas entre los grupos experimentales se calcularon mediante GraphPad Prism versión 5.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego, California, EE.UU). El análisis estadístico de los datos se realizó mediante el análisis de la varianza (ANOVA) y para la comparación entre medias se utilizaron las pruebas de *Tukey* y *t* de Welch según correspondió a cada experimento. También se utilizaron las pruebas de Chi-cuadrado, Kruskal-Wallis y *Fisher's exact* tal como se detalla en cada figura y tabla. Los gráficos fueron generados por GraphPad Prism versión 5.00 (GraphPad Software, San Diego, California, EE.UU) considerando como significativo un valor de  $p < 0,05$  (\*) y, como altamente significativo, un valor de  $p < 0,01$  (\*\*),  $p < 0,005$  (\*\*\*) y  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Sección I: evaluación de la cuantificación de SLPI sérico

#### 4.1.1. Análisis de los niveles plasmáticos de SLPI en los pacientes con ACDP

El grupo de estudio analizado incluyó 44 pacientes con ACDP y 26 voluntarios sanos como controles. Los datos clínicos y demográficos de los pacientes con ACDP se resumen en la **Tabla 3**, en donde se destaca una edad promedio de 69 años (el rango etario abarca desde los 42 a los 85 años), con similar representación de ambos sexos, índice de masa corporal (IMC) con sobrepeso para algunos pacientes y concentraciones de bilirrubina total -directa e indirecta- superiores a los valores normales en adultos. Por otro lado, también se evaluaron factores de riesgo habituales, es decir si presentan antecedentes de diabetes o de tabaquismo. Notablemente, encontramos proporciones iguales de pacientes con o sin antecedentes de diabetes, mientras que la mayoría no presentó antecedentes de tabaquismo. En cuanto a los datos de los estadios de la enfermedad en la que se encontraban los pacientes al inicio del estudio, se observa una distribución pareja entre las tres etapas evaluadas (cáncer localizado, localmente avanzado y metastásico). De los 44 pacientes incluidos en el estudio, sólo 18 pudieron ser sometidos a cirugía. También, en el análisis de la ubicación anatómica del tumor, se puede observar que un número importante de pacientes (27) presentaron el tumor en la cabeza de páncreas, en tanto que 8 lo presentaron en el cuerpo, 7 en la cola y otros 2 pacientes tuvieron otras localizaciones más allá del páncreas.

<b>Edad</b> (media $\pm$ DE; años)	69 $\pm$ 9,3
<b>Sexo</b> (femenino/masculino; %)	52/48
<b>IMC</b> (media $\pm$ DE, kg/m <sup>2</sup> )	24 $\pm$ 3,4
<b>Bilirrubina Total</b> (media $\pm$ DE; mg/dl)	101,8 $\pm$ 111,5
<b>Ubicación anatómica del tumor (%)</b>	
Cabeza (n = 27)	59,1
Cuerpo (n = 8)	20,4
Cola (n = 7)	16
Otros (n = 2)	4,5
<b>Antecedentes de Diabetes (%)</b>	
Si (n = 17)	38,6
No (n = 17)	38,6
Desconocidos (n = 10)	22,7
<b>Antecedentes de Fumador/a (%)</b>	
Si (n = 10)	22,7
No (n = 20)	45,5
Desconocidos (n = 14)	31,8
<b>Estadio de la enfermedad (%)</b>	
Localizado (n = 13)	29,5
Localmente avanzado (n = 12)	27,3
Metastásico (n = 15)	34,1
Otro (n = 4)	9,1
<b>Sometidos a cirugía (%)</b>	
Si (n = 18)	40,9
No (n = 26)	59,1

Tabla 3: Características clínicas y demográficas de los pacientes con ACDP. Se presentan las principales características de los 44 pacientes con cáncer pancreático incluidos en este estudio. DE: desvío estándar, IMC: índice de masa corporal.

En cuanto a la detección de SLPI en el suero con la técnica de ELISA sándwich, en la [Figura 6A](#) se compararon las medias de ambos grupos (sanos y con ACDP) mediante la prueba *t* de Welch. Esta prueba asume que se trata de datos independientes entre sí (no apareados) y que provienen de poblaciones gaussianas, pero no asume que tengan el mismo desvío estándar. Entonces, con un nivel de significación del 0,01 % se puede asegurar que los pacientes con ACDP poseen niveles séricos de SLPI superiores a los de las personas sanas. Este resultado coincide con un estudio anterior<sup>(103)</sup> en el que se evaluaron los niveles séricos de SLPI en un grupo de 18 personas con ACDP pero mediante



una versión multiplex del ensayo de ligadura por proximidad (PLA, del inglés *proximity ligation assay*).

Debido a la gran dispersión de los valores de SLPI sérico en los pacientes con cáncer pancreático ( $\text{Varianza}_{\text{ConACDP}} = 314,02$  versus  $\text{Varianza}_{\text{Sanos}} = 88,29$ ; significativamente diferentes según prueba F;  $p < 0,001$ ), se procedió a evaluar la distribución de frecuencia de dichos datos. En la **Figura 6B** se observa una distribución bimodal en la que se distinguen claramente dos grupos de pacientes: aquellos con niveles de SLPI bajos y aquellos con altos. El valor de corte que separa a estos dos niveles se estableció arbitrariamente en la mediana de los datos, 61,5 ng/ml, siendo el valor medio  $46,3 \pm 9$  y  $76,6 \pm 8,9$  ng/ml para valores de SLPI bajo y alto, respectivamente. Cabe destacar que, si bien nos referimos a niveles de SLPI “bajos”, la media de este grupo es significativamente mayor a la de los controles sanos (prueba de Tukey,  $p < 0,05$ ; datos no mostrados).

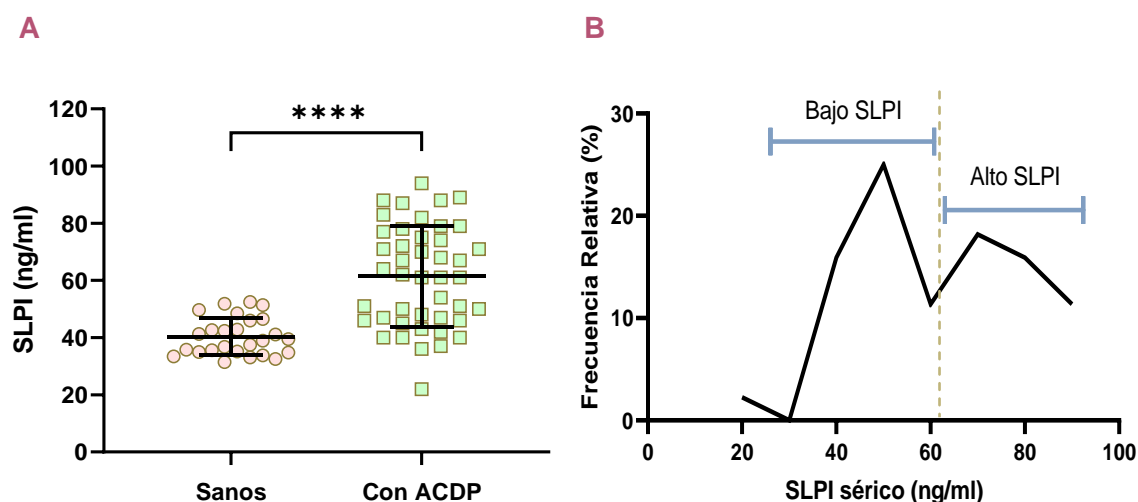


Figura 6: Concentraciones altas de SLPI en pacientes con ACDP. A) SLPI se midió con ELISA sándwich en el suero de pacientes con cáncer de páncreas y controles sanos;  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*); prueba  $t$  de Welch. B) Frecuencia relativa, medida en porcentajes, de los niveles séricos de SLPI de pacientes con cáncer de páncreas. La línea discontinua representa el punto de corte establecido en 61,5 ng/ml para distinguir entre valores altos o bajos de SLPI en el suero.

#### 4.1.2. Asociación entre los niveles de SLPI y las características clínicas de los pacientes con ACDP

Posteriormente, se realizó un análisis de correlación para encontrar asociaciones entre los niveles de la proteína y algunas de las características

clínicas de los pacientes (Figura 7). En primer lugar, se analizó la localización tumoral en aquellos pacientes que tenían alto y bajo nivel de SLPI. En la Figura 7A se puede observar que, si bien el test de Chi-cuadrado no es significativo ( $p=0,0684$ ), la mayoría de los pacientes que tienen altos valores séricos de SLPI presentan tumores localizados en la cabeza del páncreas. Asimismo, una gran parte de estos mismos pacientes -con altos niveles séricos de SLPI- poseen tumores avanzados y metastásicos (Figura 7B). Como fue mencionado en la introducción, un dato clínico importante es la posibilidad de lograr la resección quirúrgica del tumor. Es así que decidimos analizar, de manera retrospectiva, la posibilidad de lograr la resección quirúrgica entre los pacientes que tenían inicialmente niveles altos y niveles bajos de SLPI. En la Figura 7C se puede observar una tendencia de los pacientes con una alta concentración sérica de SLPI (previa a la cirugía) a tener tumores irresecables. Finalmente, se evaluó la correlación entre las concentraciones séricas de SLPI y el tiempo de recurrencia o la progresión del tumor medida en días desde el momento del diagnóstico (Figura 7D). Se observó una asociación inversa ( $r= -0,4639$ ;  $p=0.039$ ) entre los niveles séricos de SLPI y el tiempo de recurrencia o progresión de la enfermedad, indicando que mayores niveles de SLPI se asociaron a un progreso más rápido de la enfermedad.

En general, la mayoría de los pacientes a los que se les detectaron concentraciones de SLPI superiores a 61,5 ng/ml tuvieron tumores irresecables localizados en la cabeza del páncreas y enfermedad avanzada o metastásica con tiempos de recurrencia menores. Por el contrario, aquellos pacientes con baja concentración de SLPI, tienden a presentar tumores más localizados y con mejor pronóstico. En consecuencia, estos resultados sugieren que los niveles altos de SLPI, al momento del diagnóstico, se asocian con un tiempo de recurrencia más corto y una mayor velocidad de progresión tumoral, y una tendencia a presentar una mayor agresividad del tumor.

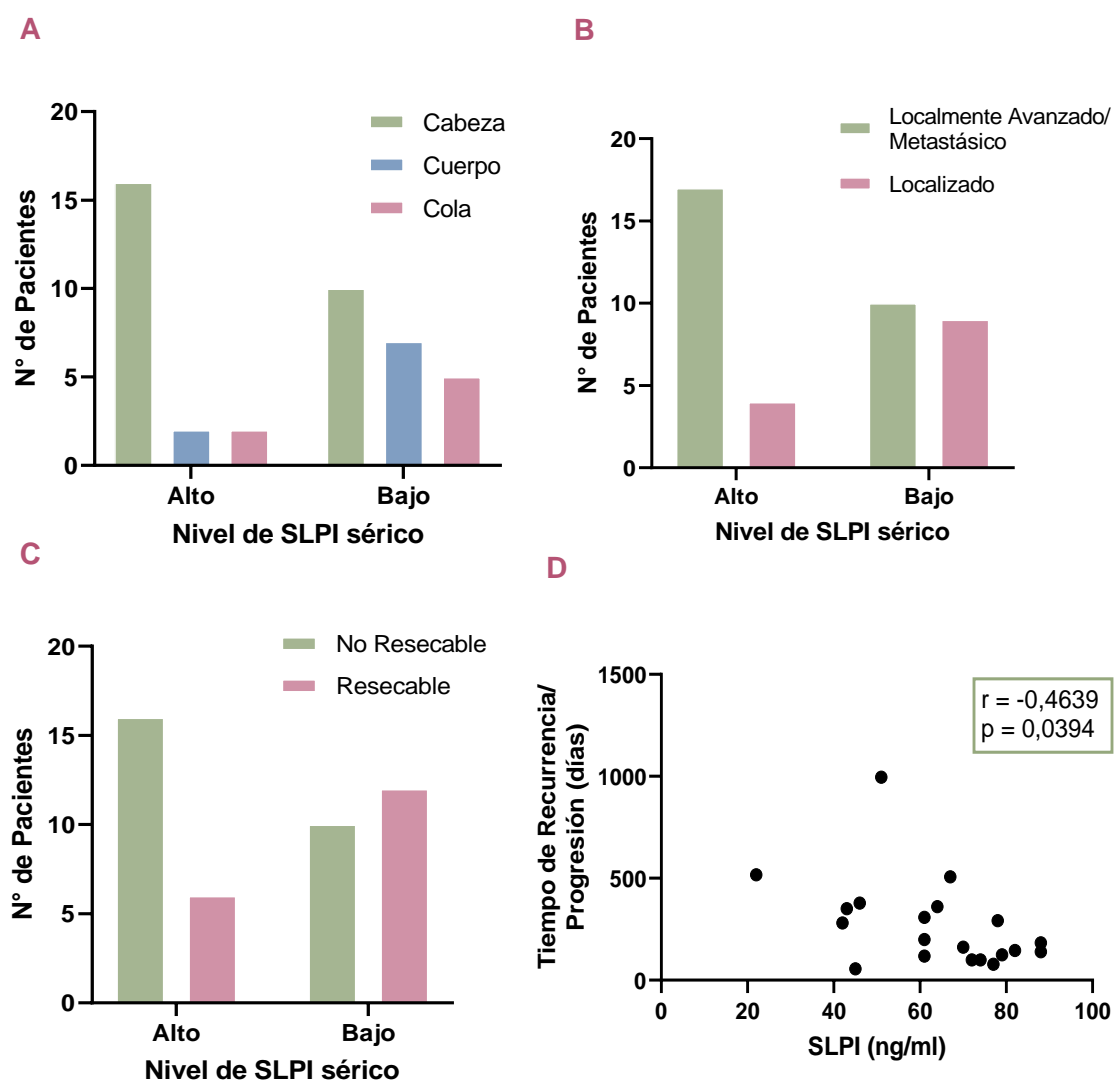


Figura 7: Relación entre los niveles de SLPI y las características clínicas de los pacientes con ACDP. **A)** Niveles séricos de SLPI en pacientes con localización tumoral en diferentes secciones de páncreas;  $p = 0.06$ ; prueba de Chi-cuadrado. **B)** Niveles séricos de SLPI en pacientes con tumor localizado y avanzado y metastásico;  $p = 0.056$ ; prueba de Chi-cuadrado. **C)** Niveles séricos de SLPI en pacientes con tumores resecables e irresecables;  $p = 0.12$ ; prueba de Fisher. **D)** Correlación entre los niveles séricos de SLPI al momento del diagnóstico y el tiempo de recurrencia o progresión de la enfermedad;  $p = 0.0394$  coeficiente de correlación de Pearson de dos colas.

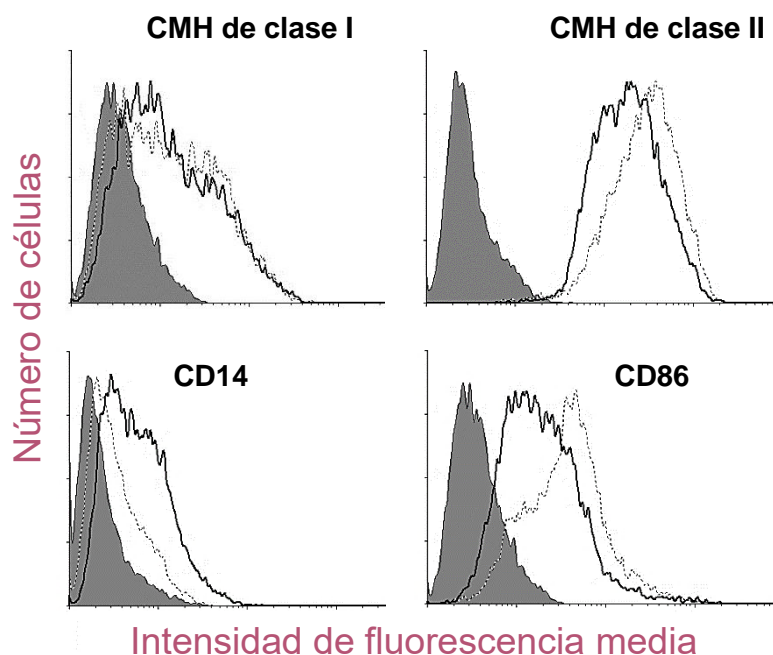
## 4.2. Sección II: estudios funcionales de SLPI sobre la respuesta inmune

### 4.2.1. Efecto de rhSLPI en la diferenciación de CD<sub>s</sub> derivadas de monocitos

Actualmente, es bien sabido que una respuesta inmune eficiente requiere la presencia y la función adecuada de las CD<sub>s</sub> (ver sección 1.3.1). Por lo tanto,

decidimos evaluar *in vitro* si SLPI podría afectar la diferenciación de monocitos en CDs. Para esto, se indujo a los monocitos humanos aislados a partir de 10 muestras de sangre periférica de sujetos sanos a diferenciarse a CDs inmaduras con IL-4 y GM-CSF en presencia o ausencia de rhSLPI. La diferenciación de monocitos a CDs fue confirmada luego de 5 días con la técnica de citometría de flujo mediante inmunomarcaciones de distintas moléculas de la superficie celular.

Para determinar la capacidad de SLPI de interferir en la diferenciación de monocitos a CDs se utilizaron los marcadores para CD14 (presente en monocitos y ausente en CDs), moléculas coestimuladoras (CD86) y el CMH de clase I y II (con mayor expresión en CDs que en monocitos). Para confirmar la especificidad de unión de los anticuerpos utilizados y descartar otras interacciones inespecíficas, se utilizaron controles de isotipo, es decir, anticuerpos que conservan las características inespecíficas de cada anticuerpo utilizado (se representan en histogramas grises). Los resultados se presentan en histogramas monoparamétricos, en los que se muestra la intensidad media de la expresión del marcador estudiado *versus* el número de células. Entonces, el desplazamiento de la curva hacia la derecha indica una mayor expresión del marcador, mientras que la altura del pico corresponde a la frecuencia de las células con dicha intensidad. En la **Figura 8** se muestra que los monocitos cultivados en presencia de IL-4 y GM-CSF y en ausencia de SLPI (grupo control, línea punteada) a los 5 días expresaron CMH de clase I y clase II y CD86 pero no CD14, es decir fueron inducidos a diferenciarse según lo esperado. Sin embargo, cuando SLPI estaba presente en los cultivos celulares, las células expresaron niveles similares de CMH clase I, niveles más bajos de CMH clase II y CD86, pero niveles más altos de CD14 en comparación con las células de control. Este resultado sugiere que SLPI afectaría negativamente la generación de CDs a partir de monocitos. Cabe destacar que los monocitos, como precursores de CDs, poseen niveles detectables de todas las moléculas analizadas<sup>(115–117)</sup>, por lo que, al inhibir la diferenciación, no se espera una disminución drástica del CMH de clase I y II, ni de CD86.



**Figura 8:** Efecto de rhSLPI en la diferenciación de células dendríticas. Los monocitos de sujetos sanos se diferenciaron con IL-4 y GM-CSF en CDs en presencia o en ausencia de 4  $\mu\text{g/ml}$  de SLPI durante 5 días. Se grafican histogramas de citometría de flujo que muestran los niveles de expresión de CMH I, CMH II, CD14 y CD86; el histograma gris representa el control del isotipo, la línea punteada representa las células sin tratamiento y la línea continua negra representa las células tratadas con SLPI. Se muestra un experimento representativo de tres experimentos independientes.

#### 4.2.2. Un modelo de estudio *in vitro* de la función de SLPI en el ACDP

Para determinar la relevancia fisiopatológica del efecto de SLPI sobre la diferenciación a CDs, y considerando que los tejidos tumorales de ACDP expresan SLPI<sup>(104)</sup>, pusimos a punto un modelo *in vitro* de co-cultivo de líneas celulares de ACDP con monocitos, a los que se los indujo a diferenciarse a CDs. En una primera etapa, analizamos la producción de SLPI por dos tipos de líneas celulares de ACDP: MIA PaCa-2 y BxPC-3. Estas células se cultivaron durante 24 h en diferentes condiciones (alta y baja confluencia, con y sin suero bovino fetal) y luego se les analizaron las concentraciones de SLPI mediante un ensayo de ELISA sándwich en los medios condicionados de las líneas celulares. En la **Figura 9** se observa que la línea MIA PaCa-2 no produjo SLPI detectable por la técnica mencionada (el rango de detección del ensayo empleado es de 0,0625 a 4 ng/ml) en ninguna de las condiciones examinadas. Sin embargo, los medios condicionados de la línea BxPC-3 cultivadas a alta confluencia mostraron niveles

detectables de SLPI indistintamente de la presencia o ausencia de suero bovino fetal en el medio condicionado.

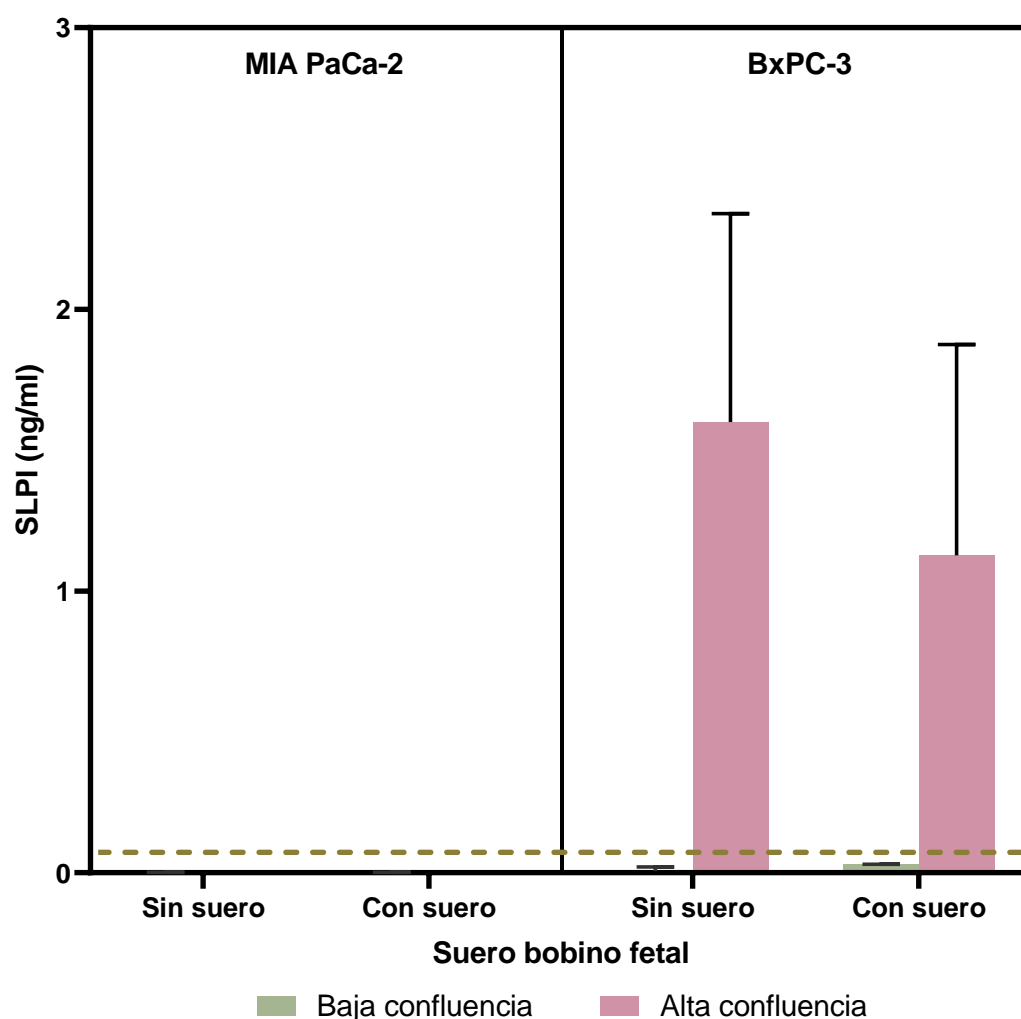


Figura 9: Producción de SLPI por líneas tumorales de ACDP en medios condicionados. Los niveles de SLPI liberados al medio de cultivo por las líneas tumorales MIA PaCa-2 y BxPC-3 fueron cuantificados con un ensayo de ELISA sándwich. Las células se incubaron por 24 h en medios con o sin suero bovino fetal y en baja o alta confluencia. Se representa la mediana y el rango intercuartílico de las concentraciones de SLPI detectadas en cada condición. La línea discontinua representa el límite de detección inferior del ensayo ELISA sándwich empleado (0,06 ng/ml).

El siguiente paso fue co-incubar monocitos y las líneas celulares de ACDP productoras o no de SLPI y estudiar la diferenciación de los monocitos en CDs. En este modelo de estudio *in vitro* en el que colocamos monocitos aislados de sangre periférica humana en la parte superior de un *Transwell* y por debajo del mismo cultivamos las dos líneas tumorales pancreáticas (MIA PaCa-2 o BxPC-

3). Los co-cultivamos durante 5 días en un medio con IL-4 y GM-CSF para inducir la diferenciación a CDs y luego estudiamos por citometría de flujo la presencia de CD14 en las células de la parte superior del *Transwell* (Figura 10).

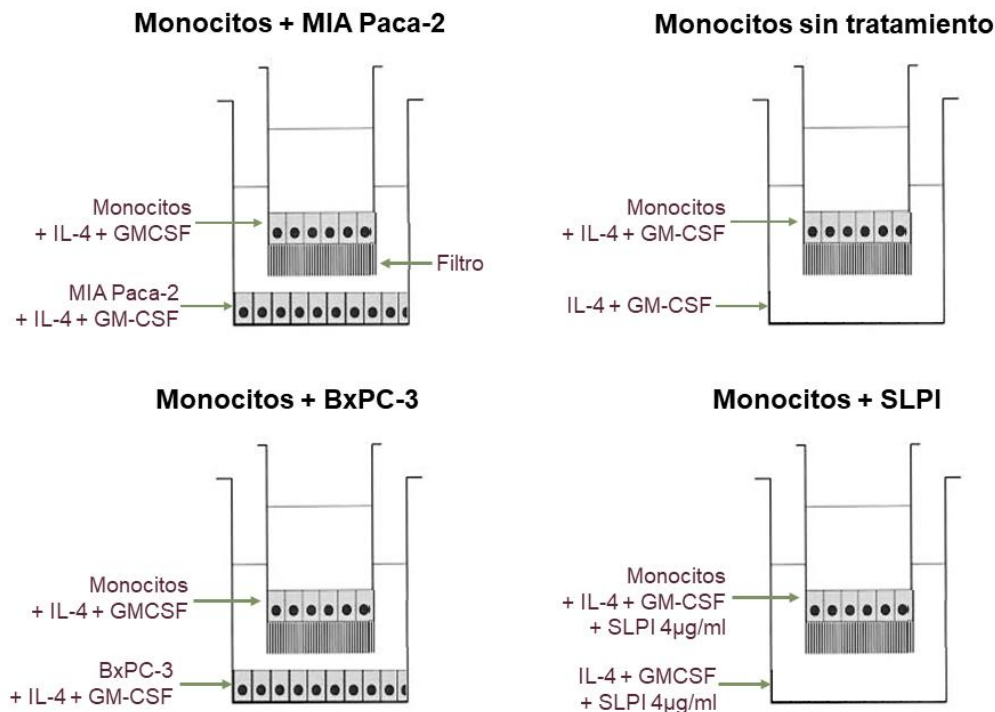


Figura 10: Esquema del modelo *in vitro* propuesto. Para la evaluación del efecto de SLPI sobre la diferenciación de monocitos a CDs en el contexto del cáncer pancreático, se planteó un modelo *in vitro* en el que se los co-cultivó con células tumorales pancreáticas productoras (BxPC-3) o no (MIA Paca-2) de SLPI, en un medio favorecedor de la diferenciación hacia CDs (con IL-4 y GM-CSF). El control negativo consistió en el cultivo únicamente de monocitos en un medio con IL-4 y GM-CSF, mientras que en el control positivo a este cultivo se le administró de manera exógena rhSLPI.

Como controles se utilizaron monocitos en ausencia de células tumorales y monocitos en ausencia de células tumorales pero en presencia de rhSLPI. Los resultados se graficaron nuevamente en histogramas de número de células *versus* la intensidad de fluorescencia media para el marcador (CD14).

En la Figura 11 se observa que los monocitos co-cultivados con la línea BxPC-3 productora de SLPI (histograma naranja) mantienen la expresión de CD14, ya que altas intensidades de fluorescencia se corresponden con un gran número de células. Por el contrario, gran parte de los monocitos co-incubados con la línea MIA PaCa-2 no productora de SLPI (histograma verde), pierden la

expresión de CD14, convirtiéndose en CDs, dado que un número muy pequeño de células presenta altas intensidades de fluorescencia para el marcador. La pérdida de expresión de CD14 también se observa en el control sin línea tumoral (histograma celeste), en consonancia con los resultados obtenidos en la sección 4.2.1. En este gráfico no se muestra el histograma correspondiente a los monocitos incubados con IL-4 + GM-CSF en presencia de rhSLPI exógeno.

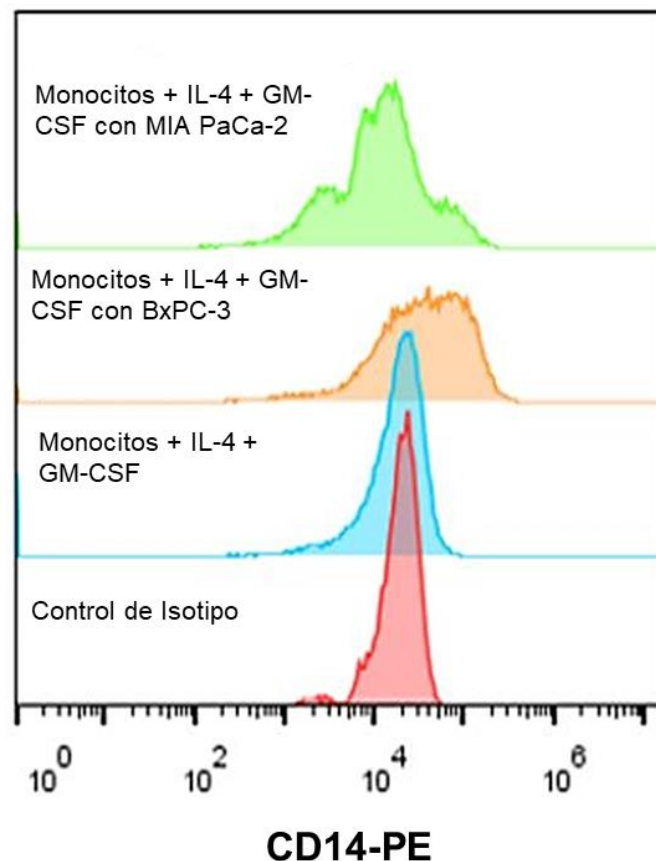


Figura 11: Efecto de SLPI producido por líneas tumorales en la diferenciación de CDs. Los monocitos de sujetos sanos se co-incubaron con la línea celular MIA PaCa-2 (histograma verde), la línea tumoral BxPC-3 (histograma naranja) o sin línea tumoral (histograma celeste) y se diferenciaron a CDs con IL-4 y GM-CSF durante 5 días. El histograma rojo representa el control del isotipo. Se grafican histogramas de citometría de flujo que muestran los niveles de expresión del marcador de monocitos CD14.

Se puede concluir que SLPI, producido por las células tumorales pancreáticas, afecta negativamente la diferenciación de los monocitos en CDs sugiriendo que SLPI podría ser un mecanismo de evasión de la respuesta antitumoral en el cáncer de páncreas.



## 5. DISCUSIÓN

Debido a la alta tasa de mortalidad del ACDP y su incidencia en aumento<sup>(6-8)</sup>, la comprensión de la biología subyacente a este cáncer agilizará el proceso de detección y el hallazgo de objetivos para un mejor y más dirigido tratamiento.

El sistema inmunológico juega un papel complejo en el desarrollo y progresión del cáncer de páncreas. Por un lado, la inflamación de este órgano (pancreatitis) puede promover la formación de lesiones premalignas y derivar en el desarrollo del cáncer de páncreas<sup>(118,119)</sup>. Por el otro, el ACDP se caracteriza por un entorno inmunosupresor<sup>(120)</sup>, que promueve la progresión y la invasión del tumor y que se distingue por el reclutamiento y activación de tipos celulares inmunosupresores y la falta de inmunidad debido a células inmunes defectuosas o ausentes<sup>(121)</sup>. En consecuencia, es imperante centrar las investigaciones en la modulación del microambiente del tumor pancreático para mejorar la eficacia de las estrategias inmunoterapéuticas.

En este trabajo, se encontró, en primer lugar, que los pacientes con ACDP poseían niveles séricos de SLPI superiores a los de las personas sanas (**Figura 6A**). Si bien esto ya se había reportado en un estudio anterior<sup>(103)</sup>, en el que se evaluó un número menor de pacientes (18 versus 44 pacientes en este trabajo), aquí identificamos a dos grupos: a) pacientes con niveles séricos menores tendientes a presentar un mejor pronóstico de la enfermedad y b) pacientes que poseían mayores concentraciones asociadas con un tiempo de recurrencia más corto y una mayor velocidad de progresión tumoral (**Figura 7**). A pesar de que sólo fue significativa la asociación entre los niveles de SLPI y el tiempo de recurrencia o progresión tumoral, consideramos, debido a las claras tendencias observadas, que es necesario aumentar el  $n$  al evaluar las características clínicas (localización tumoral, estadio del ACDP y resecabilidad), dada la faltante de datos de los pacientes. Además, al evaluar dentro de cada característica aquellos pacientes con alto o bajo nivel de SLPI sérico (en tablas de contingencia), los valores del  $n$  para cada grupo se redujeron considerablemente. Asimismo, es necesario validar en una cohorte mayor no solo estos datos sino el punto de corte exacto a partir del cual establecer las

concentraciones bajas o altas de SLPI sérico, dada la evidencia, en otros tipos de cáncer, de que SLPI es un marcador de pronóstico eficaz<sup>(95–99)</sup>.

Aumentar la significancia podría proporcionar resultados novedosos, ya que otros marcadores de pronóstico reportados para el cáncer de páncreas suelen requerir, para su detección, técnicas más invasivas o costosas que las utilizadas aquí. Por ejemplo, se ha propuesto al ADN tumoral circulante<sup>(122)</sup>, pero su detección requiere de secuenciación de próxima generación y de un análisis de la media de la frecuencia alélica de las mutaciones detectadas. La expresión de survivina, una molécula antiapoptótica, detectada por inmunohistoquímica en los tejidos tumorales de pacientes sometidos a cirugía se asoció a una menor supervivencia de los mismos<sup>(123)</sup>. Otro estudio determinó en el mismo tipo de muestra, que la relación entre el área del tejido positiva para  $\alpha$ -actina (teñida por inmunohistoquímica) y el área del tejido positiva para colágeno (teñida con anilina) también se relaciona con el pronóstico de los pacientes<sup>(124)</sup>, lo que destaca el impacto del microambiente en la progresión del cáncer y en la supervivencia del paciente. También se ha sugerido la expresión de un microARN aberrante, miR-203, medida por ensayos cuantitativos de reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa en los tejidos tumorales, como un indicador de pronóstico<sup>(125)</sup>. De la misma manera, se han propuesto, como biomarcadores, parámetros de la respuesta inflamatoria sistémica. Uno de estos, es la relación entre linfocitos y monocitos en sangre periférica que, cuando es alta, se asocia a una mayor supervivencia de los pacientes con ACDP<sup>(126)</sup>, demostrando una fuerte interacción entre la progresión y metástasis del cáncer y el sistema de inmunológico. Además, esta relación sugiere que una cantidad baja de linfocitos podría ser la razón de una reacción inmunológica débil e insuficiente al tumor y que los monocitos que se infiltran en el tejido tumoral también tienen un efecto sobre el desarrollo y la progresión tumoral. Es destacable que en muchos estudios de ACDP el pronóstico se evalúa sólo en pacientes con enfermedad resecable, mientras que aquí se incluyeron pacientes en los tres estadios de la enfermedad (resecable o localizado, localmente avanzado y metastásico). Esto sugiere que SLPI cumple un rol importante en las diferentes formas del ACDP.

En este contexto, y al ser un importante inmunomodulador, estudiamos el efecto de SLPI sobre la diferenciación de monocitos en CDs, primero utilizando rhSLPI y luego, en el contexto del ACDP, el polipéptido producido por las células tumorales pancreáticas. Encontramos que rhSLPI inhibía dicha diferenciación (Figura 8) y que las concentraciones de la molécula producida por una línea celular tumoral eran suficientes para provocar el mismo efecto (Figura 11). Es importante señalar, que con estos experimentos no intentamos estudiar en profundidad las características de las CDs sino tener un ensayo simple y rápido que permita evaluar, en un futuro, el efecto de diversas estrategias inhibitorias de la acción de SLPI en el contexto del ACDP. Sin embargo, aunque no es un objetivo de este plan, en caso de querer profundizar los mecanismos de acción de SLPI sobre la diferenciación de monocitos a CDs, esto lo podríamos hacer examinando la capacidad inmunoestimuladora y la expresión de moléculas de superficie y de factores de transcripción en las CDs.

Para generar una respuesta inmune antitumoral, es esencial la presencia de CDs en el microambiente tumoral. De forma similar a los linfocitos infiltrantes del tumor, esta presencia se asocia con un mejor pronóstico en el cáncer de páncreas<sup>(63,64)</sup>. Sin embargo, existen bajos niveles de CDs en el microambiente tumoral<sup>(65)</sup>. Quizás es posible especular que dichos niveles en el tumor podrían deberse a la acción aquí descrita para SLPI. De hecho, como se comenta anteriormente, el peor pronóstico se asocia a menores cantidades de CDs en el foco tumoral y, como hemos reportado, a mayores concentraciones de SLPI sérico. Sin embargo, es posible que el aumento de SLPI sérico no se atribuya únicamente a una mayor producción de la molécula en el microambiente tumoral, lo que inicia la incógnita sobre qué tipos celulares fuera del tumor lo estarían produciendo y porqué. Debido a la heterogeneidad tumoral, sería relevante medir la producción de SLPI en biopsias tumorales de pacientes en diferentes estadios de la enfermedad y así comprobar si existe una correlación entre los niveles locales y sistémicos del inhibidor. Cabe destacar que esto sería muy lógico debido al pequeño tamaño de SLPI, cualidad que le confiere una mejor difusión y propiedades cinéticas *in vivo*<sup>(78,127)</sup>.

Igualmente, si los monocitos no se estuvieran diferenciando a CDs a causa de SLPI, entonces es posible plantear varios caminos de diferenciación.

Se ha reportado un subconjunto de células mieloides supresoras de origen monocítico en pacientes con ACDP, con actividad inmunosupresora y que se caracterizan como células CD14<sup>+</sup> que expresan STAT3/arginasa1<sup>(68)</sup>. Por otro lado, a partir de experimentos *in vitro*, se ha postulado que el estrés oxidativo en el cáncer de páncreas podría estar induciendo la transdiferenciación de monocitos a miofibroblastos, las células más prominentes durante la reacción desmoplásica en el ACDP<sup>(69)</sup>. Además, los tejidos de ACDP en humanos estaban infiltrados por una gran cantidad de macrófagos diferenciados en el perfil antiinflamatorio o M2<sup>(128)</sup>. Estos hechos invitan a seguir investigando la función de SLPI en la diferenciación de monocitos, dado que no sólo podría estar limitando su diferenciación en CDs, sino también induciéndola hacia un perfil de diferenciación especial o particular. Además, sería interesante investigar el efecto del polipéptido en las CDs ya diferenciadas en el contexto del cáncer pancreático, ya que se ha demostrado que la función de SLPI en las CDs que lo expresan es controlar la secreción de citocinas y evitar el aumento de moléculas coestimuladoras inducido por productos microbianos<sup>(93)</sup>, lo que coincide con la observación de CDs en su forma inmadura en el microambiente tumoral del ACDP<sup>(65)</sup>.

Por otro lado, es interesante pensar qué procesos están implicados en la expresión de SLPI en las células tumorales pancreáticas, analizando los diferentes componentes de las vías implicadas en su regulación (ver [Tabla 2](#)). Incluso conocer qué vías debajo de SLPI se activan en dichas células, podría aclarar otros posibles mecanismos de evasión tumoral. Por ejemplo, es bien conocida la capacidad de SLPI de ejercer una inmunosupresión generalizada al actuar como un potente inhibidor de la vía de NF-κB<sup>(76,129)</sup>, y que, también a través de esta vía, es capaz de suprimir la producción de quimiocinas en respuesta a señales microbianas<sup>(130)</sup>; por lo que así podría estar evitando el reclutamiento de células inmunes al nicho tumoral. Como se ha mencionado anteriormente, otras publicaciones sugieren que podrían estar involucrados mecanismos que favorecerían la angiogénesis<sup>(110)</sup>, o incluso se podría especular que su actividad anti-proteasa estaría favoreciendo la fibrosis excesiva del ACDP. Con respecto a este último aspecto, sería relevante evaluar si existe

alguna asociación entre los niveles de SLPI en el suero y el aumento de la desmoplasia en el ACDP.

Como se mencionó en secciones anteriores, la mayor parte de las investigaciones en ACDP se centran en el estudio de la modulación del microambiente tumoral para mejorar la eficacia de las estrategias terapéuticas, especialmente las inmunoterapias. En este sentido, el planteo de la inhibición de SLPI pareciera ser una estrategia prometedora, al menos hipotéticamente. En primer lugar, porque no existe una condición patológica asociada con la deficiencia o ausencia de SLPI en humanos, por lo que su inhibición no causaría efectos graves a nivel sistémico. Por otro lado, debido a nuestro hallazgo (el perjuicio de la diferenciación de monocitos a CDs), al inhibir al polipéptido se esperaría un aumento de CDs en el tumor y una mejora en la respuesta inmune adaptativa antitumoral, ya que recientemente se encontró que superar la deficiencia de CDs en ACDP, tanto en etapas tempranas como avanzadas del tumor, restaura la inmunidad tumoral y mejora la capacidad de respuesta a la radioterapia<sup>(66)</sup>. En cuanto a este último aspecto, inhibir la actividad anti-proteasa de SLPI ayudaría a quebrar aún más la barrera del estroma tumoral y a aumentar la eficacia de otro tipo de terapias (quimio o radioterapia) ya implementadas. También, determinar el nivel de SLPI sérico que cada paciente presenta, además de ser un posible indicador de pronóstico, sería útil en la aplicación de una medicina personalizada, es decir, podríamos determinar para qué niveles sería útil administrar un inhibidor de SLPI y cuándo no lo sería.

En síntesis, muchos son los aspectos interesantes para seguir estudiando sobre esta molécula en el cáncer de páncreas, especialmente por la urgencia de una terapia efectiva que aumente la sobrevida de los pacientes que la padecen. Si bien en este estudio contamos con un número reducido de sujetos, obtuvimos una aproximación alentadora frente a la potencial utilidad de SLPI como un marcador de pronóstico no invasivo en el cáncer pancreático. Asimismo, en este trabajo abarcamos la hipótesis de que esta molécula podría estar afectando un punto de inflexión entre las respuestas inmunes innata y adaptativa, como es la reposición de CDs en el microambiente tumoral que, ante un análisis más exhaustivo, podría proponerse como blanco terapéutico en el tratamiento del ACDP.

## 6. CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente trabajo permiten concluir que:

1. Los pacientes con ACDP presentan niveles aumentados de SLPI en el suero con respecto a los niveles de los voluntarios sanos, distinguiéndose en dos grupos de individuos según dicha concentración: pacientes con niveles bajos y altos de SLPI.
2. Hay una tendencia de los pacientes que presentan niveles altos de SLPI a también presentar tumores en la cabeza del páncreas, localmente avanzados o metastásicos y enfermedad no resecable.
3. Existe una correlación negativa entre el tiempo de recurrencia o progresión tumoral y la concentración de SLPI en el suero de los pacientes con ACDP.
4. El SLPI exógeno (rhSLPI) o producido por células tumorales afecta negativamente la diferenciación de monocitos hacia células dendríticas, proponiéndose al polipéptido como un nuevo factor de evasión de la respuesta antitumoral en el cáncer de páncreas.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. Tortora GJ, Derrickson B. Principles of Anatomy and Physiology, Eleventh Edition. 11th ed. Vol. 11, Hoboken, NJ: J. Wiley. Hoboken, NJ: J. Wiley; 2006.
2. Dintzis SM, Liggitt D. 14 - Pancreas. In: Comparative Anatomy and Histology. 2012. p. 203–9.
3. Organization WH. Cáncer [Internet]. 2018 [cited 2021 Jan 8]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
4. Esposito I, Haeberle L, Wirth M. Cancers of the Pancreas: Pathology and Genetics. In: Reference Module in Biomedical Sciences. Elsevier; 2018.
5. Bond-Smith G, Banga N, Hammond TM, Imber CJ. Pancreatic adenocarcinoma. BMJ. 2012 May 16;344(may16 1):e2476–e2476.
6. Raimondi S, Maisonneuve P, Lowenfels AB. Epidemiology of pancreatic cancer: an overview. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2009 Dec 6;6(12):699–708.
7. Rahib L, Smith BD, Aizenberg R, Rosenzweig AB, Fleshman JM, Matrisian LM. Projecting cancer incidence and deaths to 2030: The unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the united states. Vol. 74, Cancer Research. American Association for Cancer Research Inc.; 2014. p. 2913–21.
8. Ferlay J, Partensky C, Bray F. More deaths from pancreatic cancer than breast cancer in the EU by 2017. Acta Oncol (Madr). 2016 Oct 2;55(9–10):1158–60.
9. World Health Organization. Cancer today: Argentina 2018. Vol. 558, The Global Cancer Observatory. 2019.
10. Luchini C, Capelli P, Scarpa A. Pancreatic Ductal Adenocarcinoma and Its Variants. Surg Pathol Clin. 2016 Dec;9(4):547–60.
11. Ducreux M, Cuhna AS, Caramella C, Hollebecque A, Burtin P, Goéré D, et al. Cancer of the pancreas: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Ann Oncol. 2015 Sep;26:v56–68.
12. Ho J, Li X, Zhang L, Liang Y, Hu W, Yau JCW, et al. Translational genomics in pancreatic ductal adenocarcinoma: A review with re-analysis of TCGA dataset. Semin Cancer Biol. 2019 Apr;55:70–7.

13. Haddad A, Kowdley GC, Pawlik TM, Cunningham SC. Hereditary Pancreatic and Hepatobiliary Cancers. *Int J Surg Oncol*. 2011;2011:1–10.
14. Neesse A, Michl P, Frese KK, Feig C, Cook N, Jacobetz MA, et al. Stromal biology and therapy in pancreatic cancer. *Gut*. 2011 Jun 1;60(6):861–8.
15. Xie D, Xie K. Pancreatic cancer stromal biology and therapy. *Genes Dis*. 2015 Jun;2(2):133–43.
16. Provenzano PP, Cuevas C, Chang AE, Goel VK, Von Hoff DD, Hingorani SR. Enzymatic Targeting of the Stroma Ablates Physical Barriers to Treatment of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Cell*. 2012 Mar;21(3):418–29.
17. Jacobetz MA, Chan DS, Neesse A, Bapiro TE, Cook N, Frese KK, et al. Hyaluronan impairs vascular function and drug delivery in a mouse model of pancreatic cancer. *Gut*. 2013 Jan;62(1):112–20.
18. Pandey V, Storz P. Targeting the tumor microenvironment in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2019 Jun 3;19(6):473–82.
19. White RR, Lowy AM. Clinical Management. *Cancer J*. 2017;23(6):343–9.
20. Tempero MA, Malafa MP, Chiorean EG, Czito B, Scaife C, Narang AK, et al. Guidelines Insights: Pancreatic Adenocarcinoma, Version 1.2019. *J Natl Compr Cancer Netw*. 2019 Mar 11;17(3):202–10.
21. American Joint Committee on Cancer. *AJCC Cancer Staging Manual*. 8th ed. Amin MB, Edge S, Greene F, Byrd DR, Brookland RK, Washington MK, et al., editors. Springer International Publishing; 2017. XVII, 1032.
22. Zhang Y, Frampton AE, Cohen P, Kyriakides C, Bong JJ, Habib NA, et al. Tumor Infiltration in the Medial Resection Margin Predicts Survival After Pancreaticoduodenectomy for Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *J Gastrointest Surg*. 2012 Oct 10;16(10):1875–82.
23. Survival | Pancreatic cancer | Cancer Research UK [Internet]. [cited 2020 Oct 12]. Available from: <https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/pancreatic-cancer/survival>
24. Gall TMH, Tsakok M, Wasan H, Jiao LR. Pancreatic cancer: current management and treatment strategies. *Postgrad Med J*. 2015 Oct;91(1080):601–7.



25. Yip D, Karapetis C, Strickland A, Steer CB, Goldstein D. Chemotherapy and radiotherapy for inoperable advanced pancreatic cancer. In: Yip D, editor. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2006.
26. Ruano-Ravina A, Almazán Ortega R, Guedea F. Intraoperative radiotherapy in pancreatic cancer: A systematic review. *Radiother Oncol*. 2008 Jun;87(3):318–25.
27. Neoptolemos J, Dunn J, Stocken D, Almond J, Link K, Beger H, et al. Adjuvant chemoradiotherapy and chemotherapy in resectable pancreatic cancer: a randomised controlled trial. *Lancet*. 2001 Nov;358(9293):1576–85.
28. Oettle H, Post S, Neuhaus P, Gellert K, Langrehr J, Ridwelski K, et al. Adjuvant Chemotherapy With Gemcitabine vs Observation in Patients Undergoing Curative-Intent Resection of Pancreatic Cancer. *JAMA*. 2007 Jan 17;297(3):267.
29. Neoptolemos JP, Moore MJ, Cox TF, Valle JW, Palmer DH, McDonald AC, et al. Effect of Adjuvant Chemotherapy With Fluorouracil Plus Folinic Acid or Gemcitabine vs Observation on Survival in Patients With Resected Periampullary Adenocarcinoma. *JAMA*. 2012 Jul 11;308(2):147.
30. Burris HA, Moore MJ, Andersen J, Green MR, Rothenberg ML, Modiano MR, et al. Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. *J Clin Oncol*. 1997 Jun;15(6):2403–13.
31. Kang J, Hwang I, Yoo C, Kim K, Jeong JH, Chang H-M, et al. Nab-paclitaxel plus gemcitabine versus FOLFIRINOX as the first-line chemotherapy for patients with metastatic pancreatic cancer: retrospective analysis. *Invest New Drugs*. 2018 Aug 3;36(4):732–41.
32. Williet N, Saint A, Pointet A-L, Tougeron D, Pernot S, Pozet A, et al. Folfirinox versus gemcitabine/nab-paclitaxel as first-line therapy in patients with metastatic pancreatic cancer: a comparative propensity score study. *Therap Adv Gastroenterol*. 2019 Jan 25;12:175628481987866.
33. Sohn TA, Lillemoe KD, Cameron JL, Huang JJ, Pitt HA, Yeo CJ. Surgical palliation of unresectable periampullary adenocarcinoma in the

- 1990s11No competing interests declared. Presented at the American College of Surgeons 84th Annual Clinical Congress, Orlando, FL, October 1998. *J Am Coll Surg.* 1999 Jun;188(6):658–66.
34. Baron TH. Expandable Metal Stents for the Treatment of Cancerous Obstruction of the Gastrointestinal Tract. *N Engl J Med.* 2001 May 31;344(22):1681–7.
  35. Passik SD, Breitbart WS. Depression in patients with pancreatic carcinoma: Diagnostic and treatment issues. *Cancer.* 1996 Aug 1;78(3):615–26.
  36. Borghaei H, Smith MR, Campbell KS. Immunotherapy of cancer. *Eur J Pharmacol.* 2009 Dec;625(1–3):41–54.
  37. Henriksen A, Dyhl-Polk A, Chen I, Nielsen D. Checkpoint inhibitors in pancreatic cancer. *Cancer Treat Rev.* 2019 Aug;78:17–30.
  38. Upadhrasta S, Zheng L. Strategies in Developing Immunotherapy for Pancreatic Cancer: Recognizing and Correcting Multiple Immune “Defects” in the Tumor Microenvironment. *J Clin Med.* 2019 Sep 16;8(9):1472.
  39. Roth MT, Cardin DB, Berlin JD. Recent advances in the treatment of pancreatic cancer. *F1000Research.* 2020 Feb 21;9:131.
  40. Abbas AK. *Inmunología celular y molecular Ed.9º.* 9th ed. Castellano E, editor. 2018. 576 p.
  41. Leonardo JF, Geffner. *Introducción a la Inmunología Humana.* 6ª. Editorial Médica Panamericana, editor. 2011. 584 p.
  42. Bianchi ME. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol.* 2007 Jan;81(1):1–5.
  43. Murphy, Kenneth; Weaver, Casey; Janeway C. *Janeway’s immunobiology.* 9th editio. Garland Science NY, editor. 2017. 904 pages.
  44. Steinman RM, Lustig DS, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. *J Exp Med.* 1974 Jun 1;139(6):1431–45.
  45. Traver D, Akashi K, Manz M, Merad M, Miyamoto T, Engleman EG, et al. Development of CD8 -Positive Dendritic Cells from a Common Myeloid Progenitor. *Science (80- ).* 2000 Dec 15;290(5499):2152–4.
  46. Manz MG, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL, Akashi K. Dendritic cell

- potentials of early lymphoid and myeloid progenitors. *Blood*. 2001 Jun 1;97(11):3333–41.
47. Segura E, Valladeau-Guilemond J, Donnadieu M-H, Sastre-Garau X, Soumelis V, Amigorena S. Characterization of resident and migratory dendritic cells in human lymph nodes. *J Exp Med*. 2012 Apr 9;209(4):653–60.
  48. Haniffa M, Collin M, Ginhoux F. Ontogeny and Functional Specialization of Dendritic Cells in Human and Mouse. In 2013. p. 1–49.
  49. Schlitzer A, McGovern N, Teo P, Zelante T, Atarashi K, Low D, et al. IRF4 Transcription Factor-Dependent CD11b+ Dendritic Cells in Human and Mouse Control Mucosal IL-17 Cytokine Responses. *Immunity*. 2013 May;38(5):970–83.
  50. Randolph GJ, Beaulieu S, Lebecque S, Steinman RM, Muller WA. Differentiation of monocytes into dendritic cells in a model of transendothelial trafficking. Vol. 282, *Science*. American Association for the Advancement of Science; 1998. p. 480–3.
  51. Collin M, Bigley V. Human dendritic cell subsets: an update. *Immunology*. 2018 May;154(1):3–20.
  52. van Furth R, Cohn ZA. The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *J Exp Med*. 1968;128(3):415–35.
  53. Robbins CS, Chudnovskiy A, Rauch PJ, Figueiredo JL, Iwamoto Y, Gorbатов R, et al. Extramedullary hematopoiesis generates Ly-6C high monocytes that infiltrate atherosclerotic lesions. *Circulation*. 2012 Jan 17;125(2):364–74.
  54. Cortez-Retamozo V, Etzrodt M, Newton A, Rauch PJ, Chudnovskiy A, Berger C, et al. Origins of tumor-associated macrophages and neutrophils. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Feb 14;109(7):2491–6.
  55. Williams MJ. *Drosophila Hemopoiesis and Cellular Immunity*. *J Immunol*. 2007 Apr 15;178(8):4711–6.
  56. Fogg DK, Sibon C, Miled C, Jung S, Aucouturier P, Littman DR, et al. A clonogenic bone marrow progenitor specific for macrophages and dendritic cells. *Science* (80- ). 2006 Jan 6;311(5757):83–7.
  57. Merad M, Manz MG. Dendritic cell homeostasis. Vol. 113, *Blood*. American Society of Hematology; 2009. p. 3418–27.

58. Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, Dalod M, Grau V, Hart DN, et al. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. Vol. 116, *Blood*. American Society of Hematology; 2010. p. e74–80.
59. Marimuthu R, Francis H, Dervish S, Li SCH, Medbury H, Williams H. Characterization of human monocyte subsets by whole blood flow cytometry analysis. *J Vis Exp*. 2018;2018(140):57941.
60. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol*. 2002 Nov;3(11):991–8.
61. Ino Y, Yamazaki-Itoh R, Shimada K, Iwasaki M, Kosuge T, Kanai Y, et al. Immune cell infiltration as an indicator of the immune microenvironment of pancreatic cancer. *Br J Cancer*. 2013 Mar 5;108(4):914–23.
62. Kunk PR, Bauer TW, Slingluff CL, Rahma OE. From bench to bedside a comprehensive review of pancreatic cancer immunotherapy. Vol. 4, *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*. BioMed Central Ltd.; 2016. p. 1–12.
63. Yamamoto T, Yanagimoto H, Satoi S, Toyokawa H, Yamao J, Kim S, et al. Circulating myeloid dendritic cells as prognostic factors in patients with pancreatic cancer who have undergone surgical resection. *J Surg Res*. 2012 Apr;173(2):299–308.
64. Fukunaga A, Miyamoto M, Cho Y, Murakami S, Kawarada Y, Oshikiri T, et al. CD8+tumor-infiltrating lymphocytes together with CD4+tumor-infiltrating lymphocytes and dendritic cells improve the prognosis of patients with pancreatic adenocarcinoma. *Pancreas*. 2004;28(1).
65. Tjomsland V, Spångeus A, Sandström P, Borch K, Messmer D, Larsson M. Semi mature blood dendritic cells exist in patients with ductal pancreatic adenocarcinoma owing to inflammatory factors released from the tumor. *PLoS One*. 2010;5(10).
66. Hegde S, Krisnawan VE, Herzog BH, Zuo C, Breden MA, Knolhoff BL, et al. Dendritic Cell Paucity Leads to Dysfunctional Immune Surveillance in Pancreatic Cancer. *Cancer Cell*. 2020 Mar 16;37(3):289-307.e9.
67. Sanford DE, Belt BA, Panni RZ, Mayer A, Deshpande AD, Carpenter D, et al. Inflammatory monocyte mobilization decreases patient survival in pancreatic cancer: A role for targeting the CCL2/CCR2 axis. *Clin Cancer*

- Res. 2013 Jul 1;19(13):3404–15.
68. Trovato R, Fiore A, Sartori S, Canè S, Giugno R, Cascione L, et al. Immunosuppression by monocytic myeloid-derived suppressor cells in patients with pancreatic ductal carcinoma is orchestrated by STAT3. *J Immunother Cancer*. 2019 Sep 18;7(1):1–16.
  69. Huang X, He C, Hua X, Kan A, Mao Y, Sun S, et al. Oxidative stress induces monocyte-to-myofibroblast transdifferentiation through p38 in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clin Transl Med*. 2020 Jun 4;10(2).
  70. Thompson RC, Ohlsson K. Isolation, properties, and complete amino acid sequence of human secretory leukocyte protease inhibitor, a potent inhibitor of leukocyte elastase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986;83(18):6692–6.
  71. Walter M, Plotnick M, Schechter NM. Inhibition of human mast cell chymase by secretory leukocyte proteinase inhibitor: Enhancement of the interaction by heparin. *Arch Biochem Biophys*. 1996 Mar 1;327(1):81–8.
  72. Ohlsson K, Bergenfeldt M, Björk P. Functional studies of human secretory leukocyte protease inhibitor. *Adv Exp Med Biol*. 1988;240:123–31.
  73. Abe T, Kobayashi N, Yoshimura K, Trapnell BC, Kim H, Hubbard RC, et al. Expression of the secretory leukoprotease inhibitor gene in epithelial cells. *J Clin Invest*. 1991;87(6):2207–15.
  74. Hollander C, Sitkauskiene B, Sakalauskas R, Westin U, Janciauskiene SM. Serum and bronchial lavage fluid concentrations of IL-8, SLPI, sCD14 and sICAM-1 in patients with COPD and asthma. *Respir Med*. 2007 Sep 1;101(9):1947–53.
  75. Taggart CC, Cryan S-A, Weldon S, Gibbons A, Greene CM, Kelly E, et al. Secretory leucoprotease inhibitor binds to NF- $\kappa$ B binding sites in monocytes and inhibits p65 binding. *J Exp Med*. 2005 Dec 19;202(12):1659–68.
  76. Xu W, He B, Chiu A, Chadburn A, Shan M, Buldys M, et al. Epithelial cells trigger frontline immunoglobulin class switching through a pathway regulated by the inhibitor SLPI. *Nat Immunol*. 2007 Mar 28;8(3):294–303.
  77. Gomez SA, Argüelles CL, Guerrieri D, Tateosian NL, Amiano NO, Slimovich R, et al. Secretory Leukocyte Protease Inhibitor. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009 Feb;179(3):247–53.

78. Williams SE, Brown TI, Roghanian A, Sallenave J-M. SLPI and elafin: one glove, many fingers. *Clin Sci*. 2006 Jan 1;110(1):21–35.
79. Kikuchi T, Abe T, Hoshi S, Matsubara N, Tominaga Y, Satoh K, et al. Structure of the Murine Secretory Leukoprotease Inhibitor ( Slpi ) Gene and Chromosomal Localization of the Human and Murine SLPI Genes. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1998 Dec;19(6):875–80.
80. Stetler G, Brewer MT, Thompson RC. Isolation and sequence of a human gene encoding a potent inhibitor of leukocyte proteases. *Nucleic Acids Res*. 1986 Oct 24;14(20):7883–96.
81. Jin F, Nathan CF, Radzioch D, Ding A. Lipopolysaccharide-related stimuli induce expression of the secretory leukocyte protease inhibitor, a macrophage-derived lipopolysaccharide inhibitor. *Infect Immun*. 1998 Jun;66(6):2447–52.
82. van Wetering S, van der Linden AC, van Sterkenburg MA, Rabe KF, Schalkwijk J, Hiemstra PS. Regulation of secretory leukocyte proteinase inhibitor (SLPI) production by human bronchial epithelial cells: increase of cell-associated SLPI by neutrophil elastase. *J Investig Med*. 2000 Sep;48(5):359–66.
83. Sallenave JM, Shulmann J, Crossley J, Jordana M, Gauldie J. Regulation of secretory leukocyte proteinase inhibitor (SLPI) and elastase-specific inhibitor (ESI/elafin) in human airway epithelial cells by cytokines and neutrophilic enzymes. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1994 Dec;11(6):733–41.
84. van Wetering S, van der Linden AC, van Sterkenburg MA, de Boer WI, Kuijpers AL, Schalkwijk J, et al. Regulation of SLPI and elafin release from bronchial epithelial cells by neutrophil defensins. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2000 Jan;278(1):L51-8.
85. Tateosian NL, Pasquinelli V, Hernández Del Pino RE, Ambrosi N, Guerrieri D, Pedraza-Sánchez S, et al. The Impact of IFN- $\gamma$  Receptor on SLPI Expression in Active Tuberculosis. *Am J Pathol*. 2014 May;184(5):1268–73.
86. Jaumann F, Elssner A, Mazur G, Dobmann S, Vogelmeier C, for the Munich Lung Transplant Group. Transforming growth factor- $\beta$ 1 is a potent inhibitor of secretory leukoprotease inhibitor expression in a bronchial epithelial cell line. *Eur Respir J*. 2000 Jun;15(6):1052.

87. Ashcroft GS, Lei K, Jin W, Longenecker G, Kulkarni AB, Greenwell-Wild T, et al. Secretory leukocyte protease inhibitor mediates non-redundant functions necessary for normal wound healing. *Nat Med.* 2000 Oct;6(10):1147–53.
88. Ashcroft GS, Jeong M-J, Ashworth JJ, Hardman M, Jin W, Moutsopoulos N, et al. Tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) is a therapeutic target for impaired cutaneous wound healing. *Wound Repair Regen.* 2012 Jan;20(1):38–49.
89. Zhu J, Nathan C, Jin W, Sim D, Ashcroft GS, Wahl SM, et al. Conversion of Proepithelin to Epithelins. *Cell.* 2002 Dec;111(6):867–78.
90. Nakamura A, Mori Y, Hagiwara K, Suzuki T, Sakakibara T, Kikuchi T, et al. Increased Susceptibility to LPS-induced Endotoxin Shock in Secretory Leukoprotease Inhibitor (SLPI)-deficient Mice. *J Exp Med.* 2003 Mar 3;197(5):669–74.
91. Chuluyan E, Casadei D, Ambrosi N, Caro F, Guerrieri D. The Role of Secretory Leukocyte Proteinase Inhibitor During Transplantation. *Curr Transplant Reports.* 2019;6(1):69–77.
92. Majchrzak-Gorecka M, Majewski P, Grygier B, Murzyn K, Cichy J. Secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI), a multifunctional protein in the host defense response. Vol. 28, *Cytokine and Growth Factor Reviews.* Elsevier Ltd; 2016. p. 79–93.
93. Samsom JN, van der Marel APJ, van Berkel LA, van Helvoort JMLM, Simons-Oosterhuis Y, Jansen W, et al. Secretory Leukoprotease Inhibitor in Mucosal Lymph Node Dendritic Cells Regulates the Threshold for Mucosal Tolerance. *J Immunol.* 2007 Nov 15;179(10):6588–95.
94. Vroling AB, Konijn T, Samsom JN, Kraal G. The production of secretory leukocyte protease inhibitor by dendritic cells. *Mol Immunol.* 2011 Jan;48(4):630–6.
95. Zelvyte I, Wallmark A, Piitulainen E, Westin U, Janciauskiene S. Increased plasma levels of serine proteinase inhibitors in lung cancer patients. *Anticancer Res.* 24(1):241–7.
96. Cheng W-L, Wang C-S, Huang Y-H, Liang Y, Lin PY, Hsueh C, et al. Overexpression of a secretory leukocyte protease inhibitor in human gastric cancer. *Int J Cancer.* 2008 Oct 15;123(8):1787–96.

97. Tsukishiro S, Suzumori N, Nishikawa H, Arakawa A, Suzumori K. Use of serum secretory leukocyte protease inhibitor levels in patients to improve specificity of ovarian cancer diagnosis. *Gynecol Oncol.* 2005 Feb;96(2):516–9.
98. Liu G, Yang J, Zhao Y, Wang Z, Xing B, Wang L, et al. Expression of secretory leukocyte protease inhibitor detected by immunohistochemistry correlating with prognosis and metastasis in colorectal cancer. *World J Surg Oncol.* 2014;12(1):369.
99. Wei Z, Liu G, Jia R, Zhang W, Li L, Zhang Y, et al. Targeting secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) inhibits colorectal cancer cell growth, migration and invasion via downregulation of AKT. *PeerJ.* 2020;8:e9400.
100. Sriuranpong V, Mutirangura A, Gillespie JW, Patel V, Amornphimoltham P, Molinolo AA, et al. Global Gene Expression Profile of Nasopharyngeal Carcinoma by Laser Capture Microdissection and Complementary DNA Microarrays. *Clin Cancer Res.* 2004 Aug 1;10(15):4944–58.
101. Liang G, Gonzales FA, Jones PA, Orntoft TF, Thykjaer T. Analysis of gene induction in human fibroblasts and bladder cancer cells exposed to the methylation inhibitor 5-aza-2'-deoxycytidine. *Cancer Res.* 2002 Feb 15;62(4):961–6.
102. Kluger HM, Kluger Y, Gilmore-Hebert M, DiVito K, Chang JT, Rodov S, et al. cDNA microarray analysis of invasive and tumorigenic phenotypes in a breast cancer model. *Lab Invest.* 2004 Mar;84(3):320–31.
103. Fredriksson S, Horecka J, Terje Brustugun O, Schlingemann J, Koong AC, Tibshirani R, et al. Multiplexed Proximity Ligation Assays to Profile Putative Plasma Biomarkers Relevant to Pancreatic and Ovarian Cancer. *Clin Chem.* 2008 Mar 1;54(3):582–9.
104. Zhang W, Yao J-L, Dong S-C, Hou F-Q, Shi H-P. SLPI knockdown induced pancreatic ductal adenocarcinoma cells proliferation and invasion. *Cancer Cell Int.* 2015 Dec 1;15(1):37.
105. Nakamura K, Takamoto N, Hongo A, Kodama J, Abrzua F, Nasu Y, et al. Secretory leukoprotease inhibitor inhibits cell growth through apoptotic pathway on ovarian cancer. *Oncol Rep.* 2008 May 1;
106. Zhang D, Simmen RCM, Michel FJ, Zhao G, Vale-Cruz D, Simmen FA. Secretory Leukocyte Protease Inhibitor Mediates Proliferation of Human



- Endometrial Epithelial Cells by Positive and Negative Regulation of Growth-associated Genes. *J Biol Chem.* 2002 Aug;277(33):29999–30009.
107. Devoogdt N, Hassanzadeh Ghassabeh G, Zhang J, Brys L, De Baetselier P, Revets H. Secretory leukocyte protease inhibitor promotes the tumorigenic and metastatic potential of cancer cells. *Proc Natl Acad Sci.* 2003 May 13;100(10):5778–82.
  108. Johnsen M, Lund LR, Rømer J, Almholt K, Danø K. Cancer invasion and tissue remodeling: Common themes in proteolytic matrix degradation. *Curr Opin Cell Biol.* 1998;10(5):667–71.
  109. Liotta LA, Kohn EC. The microenvironment of the tumour–host interface. *Nature.* 2001 May;411(6835):375–9.
  110. Sugino T, Yamaguchi T, Ogura G, Kusakabe T, Goodison S, Homma Y, et al. The secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) suppresses cancer cell invasion but promotes blood-borne metastasis via an invasion-independent pathway. *J Pathol.* 2007 Jun;212(2):152–60.
  111. Wen J, Nikitakis NG, Chaisuparat R, Greenwell-Wild T, Gliozzi M, Jin W, et al. Secretory Leukocyte Protease Inhibitor (SLPI) Expression and Tumor Invasion in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Am J Pathol.* 2011 Jun;178(6):2866–78.
  112. Nugteren S, Goos JACM, Delis-van Diemen PM, Simons-Oosterhuis Y, Lindenbergh-Kortleve DJ, van Haaften DH, et al. Expression of the immune modulator secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) in colorectal cancer liver metastases and matched primary tumors is associated with a poorer prognosis. *Oncoimmunology.* 2020 Jan 1;9(1):1832761.
  113. Galustian C, Vyakarnam A, Elhage O, Hickman O, Dasgupta P, Smith RA. Immunotherapy of prostate cancer: identification of new treatments and targets for therapy, and role of WAP domain-containing proteins. *Biochem Soc Trans.* 2011 Oct 1;39(5):1433–6.
  114. Amiano NO, Costa MJ, Reiteri RM, Payés C, Guerrieri D, Tateosian NL, et al. Anti-tumor effect of SLPI on mammary but not colon tumor growth. *J Cell Physiol.* 2013 Feb;228(2):469–75.
  115. Fleischer J, Soeth E, Reiling N, Grage-Griebenow E, Flad H -D., Ernst M. Differential expression and function of CD80 (B7-1) and CD86 (B7-2) on

- human peripheral blood monocytes. *Immunology*. 1996 Dec 30;89(4):592–8.
116. Milillo MA, Velásquez LN, Trotta A, Delpino MV, Marinho F V., Balboa L, et al. B. abortus RNA is the component involved in the down-modulation of MHC-I expression on human monocytes via TLR8 and the EGFR pathway. Coombes BK, editor. *PLOS Pathog*. 2017 Aug 2;13(8):e1006527.
117. Bunbury A, Potolicchio I, Maitra R, Santambrogio L. Functional analysis of monocyte MHC class II compartments. *FASEB J*. 2009 Jan 24;23(1):164–71.
118. Pinho A V., Chantrill L, Rooman I. Chronic pancreatitis: A path to pancreatic cancer. *Cancer Lett*. 2014 Apr;345(2):203–9.
119. Lowenfels AB, Maisonneuve P, Cavallini G, Ammann RW, Lankisch PG, Andersen JR, et al. Pancreatitis and the Risk of Pancreatic Cancer. *N Engl J Med*. 1993 May 20;328(20):1433–7.
120. Clark CE, Hingorani SR, Mick R, Combs C, Tuveson DA, Vonderheide RH. Dynamics of the Immune Reaction to Pancreatic Cancer from Inception to Invasion. *Cancer Res*. 2007 Oct 1;67(19):9518–27.
121. Inman KS. Complex role for the immune system in initiation and progression of pancreatic cancer. *World J Gastroenterol*. 2014;20(32):11160.
122. Pietrasz D, Pécuchet N, Garlan F, Didelot A, Dubreuil O, Doat S, et al. Plasma Circulating Tumor DNA in Pancreatic Cancer Patients Is a Prognostic Marker. *Clin Cancer Res*. 2017 Jan 1;23(1):116–23.
123. Kami K, Doi R, Koizumi M, Toyoda E, Mori T, Ito D, et al. Survivin expression is a prognostic marker in pancreatic cancer patients. *Surgery*. 2004 Aug;136(2):443–8.
124. Erkan M, Michalski CW, Rieder S, Reiser–Erkan C, Abiatari I, Kolb A, et al. The Activated Stroma Index Is a Novel and Independent Prognostic Marker in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2008 Oct;6(10):1155–61.
125. Ikenaga N, Ohuchida K, Mizumoto K, Yu J, Kayashima T, Sakai H, et al. MicroRNA-203 Expression as a New Prognostic Marker of Pancreatic Adenocarcinoma. *Ann Surg Oncol*. 2010 Dec 22;17(12):3120–8.

126. Stotz M, Szkandera J, Stojakovic T, Seidel J, Samonigg H, Kornprat P, et al. The lymphocyte to monocyte ratio in peripheral blood represents a novel prognostic marker in patients with pancreatic cancer. *Clin Chem Lab Med*. 2015 Jan 1;53(3).
127. Boudier C, Bieth JG. Mucus proteinase inhibitor: a fast-acting inhibitor of leucocyte elastase. *Biochim Biophys Acta - Protein Struct Mol Enzymol*. 1989 Mar;995(1):36–41.
128. Komura T, Sakai Y, Harada K, Kawaguchi K, Takabatake H, Kitagawa H, et al. Inflammatory features of pancreatic cancer highlighted by monocytes/macrophages and <scp>CD</scp> 4+ T cells with clinical impact. *Cancer Sci*. 2015 Jun 12;106(6):672–86.
129. Ding A, Thieblemont N, Zhu J, Jin F, Zhang J, Wright S. Secretory Leukocyte Protease Inhibitor Interferes with Uptake of Lipopolysaccharide by Macrophages. Moore RN, editor. *Infect Immun*. 1999 Sep 1;67(9):4485–9.
130. Menckeberg CL, Hol J, Simons-Oosterhuis Y, Raatgeep H (Rolien) C, de Ruiten LF, Lindenbergh-Kortleve DJ, et al. Human buccal epithelium acquires microbial hyporesponsiveness at birth, a role for secretory leukocyte protease inhibitor. *Gut*. 2015 Jun;64(6):884–93.