UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA BIOLÓGICA

Fisiopatología y terapéutica del trasplante de órganos sólidos

Tesis presentada para optar por el título de Doctora de la Universidad de Buenos Aires en el área de Química Biológica

Lic. Nella Gabriela Ambrosi

Director: Dr. Eduardo Chuluyan

Consejero de estudios: Dra. Verónica García

Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos

Facultad de Medicina - UBA

Buenos Aires

Fecha de defensa: 28/03/2017

Resumen

El daño irreversible de órganos es uno de los principales desafíos de la salud. Una manera de mitigar este problema es a través de la realización de trasplantes de órganos. Si bien el trasplante ha alcanzado un grado de éxito considerable, varios factores limitan significativamente su efectividad. En este contexto las reacciones inflamatorias en el injerto tienen una influencia fundamental en el funcionamiento del órgano a corto y a largo plazo. Una de las principales razones de la reacción inflamatoria inicial, es el daño generado por la isquemia y la reperfusión (IRI) del órgano, condicionando así el tiempo de recuperación de la función del órgano post-trasplante. En el caso del trasplante renal, la entidad clínica denominada función retrasada del injerto (DGF), es una situación clínica frecuente donde el órgano tarda en recuperar la función luego del trasplante. En otros tipos de trasplante, como el hepático, también se describen eventos adversos en la etapa inmediata post-trasplante. En este caso, se puede presentar un síndrome denominado "síndrome por reperfusión" (SPR), que se manifiesta como una descompensación del receptor del trasplante. Datos bibliográficos indican que tanto especies reactivas del oxígeno como mediadores de la respuesta inmune participarían en estos eventos adversos iniciales. Por lo tanto, estrategias terapéuticas que tiendan a limitar la acción de radicales libres así como inmunomoduladores como el Inhibidor Secretorio de Proteasas Leucocitarias (SLPI), podrían ejercer efectos beneficiosos en el trasplante.

En esta tesis, se estudió la fisiopatología y terapéutica en trasplante de órganos sólidos, evaluando: i) diversos mediadores inmunes vinculados al DGF; ii) al SLPI como biomarcador de daño renal; iii) los efectos de un antioxidante en el resultado a corto plazo en trasplante renopancreático, hepático y renal y iv) la función de SLPI en trasplante renal.

Los resultados obtenidos demostraron niveles diferenciales de mediadores inflamatorios en pacientes con DGF *versus* pacientes sin DGF, observando correlaciones entre los niveles de los transcriptos y factores de riesgo tanto del donante como del receptor, así como también con indicadores de funcionamiento renal. Además, se pudo observar que los niveles del SLPI en líquido de perfusión renal podrían ser utilizados como un biomarcador del estado del órgano a trasplantar ya que la mayoría de los pacientes que sufren DGF presentan niveles elevados de SLPI en el líquido de perfusión.

Por otra parte, el bloqueo de las especies reactivas del oxígeno resultantes del IRI principalmente en el donante, disminuyó los niveles de citoquinas proinflamatorias,

alarminas plasmáticas, los eventos de pancreatitis, DGF, SPR y la frecuencia de diálisis post-trasplante en pacientes trasplantados renopancreáticos, hepáticos y renales.

Como otra opción de tratamiento para IRI, decidimos evaluar la capacidad terapéutica del SLPI en un modelo animal. En este caso pudimos determinar que el tratamiento con SLPI disminuyó la necrosis tubular aguda y mejoró el funcionamiento renal. Teniendo en cuenta estos resultados, se estudió la función del SLPI en el trasplante renal. Se pudo determinar que los niveles plasmáticos de SLPI se correlacionan de forma directa con la creatinina plasmática. Este resultado no se debía a una falta de respuesta de las células del paciente trasplantado al SLPI, ni a un efecto tóxico de su parte. Por el contrario, se determinó que el SLPI posee capacidad inhibitoria de apoptosis frente a la toxicidad generada por un inhibidor de calcineurina (FK506). Mediante un microarreglo determinamos que el efecto protector del SLPI esta mediado por la disminución de mediadores vinculados con muerte celular, hipoxia, respuesta inflamatoria y estrés osmótico, aumentando notablemente las proteínas de choque térmico y su receptor TLR4.

Se pudo observar que los pacientes trasplantados presentaban niveles plasmáticos elevados de SLPI y que los monocitos de pacientes trasplantados producen SLPI en respuesta a estímulos de células apoptóticas. Por último, evaluamos la posibilidad de utilizar al SLPI plasmático como biomarcador de daño o protección del injerto. Obtuvimos un índice SPLI/creatinina plasmática, cuyos valores altos o bajos se asocian con episodios de rechazo.

En conjunto estos resultados nos permitieron identificar mediadores inflamatorios diferenciales en pacientes con DGF, los cuales se asocian con determinados factores de riesgo. Asimismo, determinamos un efecto protector a corto plazo del ácido lipoico en protocolos clínicos de trasplante renopancreático, hepático y renal, y del SLPI en modelos de daño renal. Por último, identificamos niveles elevados de SLPI, en pacientes trasplantados renales, cuya función sería la de limitar el daño por mecanismos de retroalimentación negativa.

Pathophysiology and Therapy in Solid Organ Transplantation

The irreversible organ damage is one of the major challenges in healthcare. One way to mitigate this problem is through performing organ transplants. Although the transplant has achieved a considerable degree of success, several factors significantly limit its effectiveness. In this context, inflammatory reactions in the graft have a fundamental influence on organ function in short and long term One of the main reasons for the initial inflammatory reaction in a transplanted organ is the ischemia-reperfusion injury (IRI). This phenomenon limits the recovery time of the transplanted organs. In case of kidney transplantation, it is called “Delayed Graft Function” (DGF). It is a common clinical situation where the function of the transplanted organ decreases after transplantation. DGF is associated with an increased immunogenicity of the graft and the presence and frequency of episodes of acute rejection, and therefore determines a higher risk of graft loss and a decrease in long-term survival. In other types of transplants, such as liver, there are also adverse events in the immediate post-transplant stage. In this case, it has been described a "Reperfusion Syndrome" (RPS), which includes an hemodinamic decompensation of the recipient during the surgery. Previous works indicates that both reactive oxygen species and mediators of the immune response would participate in these initial adverse events. Therefore, therapeutic strategies that tend to limit the action of free radicals as well as immunomodulators such as the Secretory Inhibitor of Leukocyte Proteases (SLPI), could exert beneficial effects in transplantation.

In this thesis, we studied the pathophysiology and therapy in solid organ transplantation, evaluating: i) several immune mediators linked to DGF; ii) SLPI as a biomarker of renal damage; iii) the effects of an antioxidant on the short-term outcome in renopacreatic, hepatic and renal transplantation, and iv) the role of SLPI in renal transplantation.

First, we compared transcripts of inflammatory mediators in patients with DGF vs patients without DGF. The most relevant differences found between patients with DGF and without DGF were IFN-α and TGF-β. Also, we found correlations among inflammatory mediators and donor and recipient risk factors, as well as with indicators of kidney function. In addition, it was observed that SLPI levels in renal perfusion fluid could be used as a biomarker to predict the outcome of renal transplantation since the majority of patients suffering from DGF had elevated levels of SLPI in perfusion fluid.

On the other hand, the blockade of reactive oxygen species resulting from IRI, decreased levels of proinflammatory cytokines, plasmatics alarmins, events of pancreatitis, DGF, RPS and the frequency of post-transplant dialysis in renopancreatic, hepatic and renal transplanted patients.

As another option for treatment of IRI, we decided to assess the therapeutic capacity of SLPI in an animal model. In this case we were able to determine that treatment with SLPI decreased acute tubular necrosis and improved renal function. Taking into account these results, the role of SLPI in kidney transplantation was studied. Plasma levels of SLPI could be determined to be directly correlated with plasma creatinine. This result was not due to a lack of response of the transplanted patient's cells to SLPI, nor to a toxic effect. In contrast, it was determined that SLPI possesses apoptosis inhibitory capacity against toxicity generated by a calcineurin inhibitor (FK506). Through a microarray we determined that the protective effect of SLPI is mediated by the decrease of mediators associated with cell death, hypoxia, inflammatory response and osmotic stress, significantly increasing heat shock proteins and TLR4 receptor.

It was observed that transplanted patients had elevated plasma levels of SLPI and that monocytes from transplant patients produced SLPI in response to apoptotic cell stimuli. Finally, we evaluated the possibility of using plasma SLPI as a biomarker of graft damage or protection. We obtained a plasma SPLI / creatinine index, whose high or low values are associated with episodes of rejection.

Together these results allowed us to identify differential inflammatory mediators in patients with FGD, which are associated with certain risk factors. We also determined a short-term protective effect of lipoic acid in clinical protocols for renopancreatic, hepatic and renal transplantation and SLPI in renal damage models. Finally, we identified elevated levels of SLPI in renal transplant patients whose function would be to limit the damage by negative feedback mechanisms.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quería agradecer al Dr Chuluyan por haber sido el Director de esta Tesis, por su compromiso y dedicación a la ciencia, por su ayuda, entusiasmo, generosidad y por su guía. Por abrirme las puertas de su laboratorio y permitirme formar parte todos estos años.

A CONICET por el otorgamiento de la Beca Doctoral gracias a la cual pude realizar esta Tesis.

Al Dr Guerrieri por todos estos años de trabajo, por su paciencia y compañerismo, por su calidez humana y enseñanzas.

A los médicos, bioquímicos y enfermeros del INBA y Hospital Italiano, principalmente al Dr Casadei, y Dra Casciato, gracias a su colaboración se pudo llevar a cabo esta Tesis, siendo pilares fundamentales para su desarrollo. A la Dra Julia Rocamora y a Bqa. Marcela Lanfranconi.

Al Dr Incardona y GADOR por el apoyo a la ciencia.

A mis compañeros de laboratorio, Fiore, Fran, Geral, Denise, Juan, que hacen el día a día más divertido, por formar un grupo de trabajo donde todos se ayudan y apoyan. A Mercedes Sanchez.

A los integrantes de instituto CEFYBO, secretarias, técnicos, investigadores y becarios, que generan un clima de trabajo amistoso, donde se disfruta el día a día rodeado de gente con ganas de ayudar, de brindarse y de enseñar.

A Fede, Sofi, Ale, Lau, Fer, Kiki, Gaby, Pancho, Nico, Vale, Pabli y Barbi por dejarme ser parte de un grupo tan lindo y divertido, por las salidas, las anécdotas, los viajes.

A Marian y Betu por haber sido parte de este crecimiento, por compartir las alegrías y penas, por el desahogo, las risas y por acompañarnos.

A Carlos y Nora por hacerme parte de su familia.

A mis amigas Debo, Mar, Cris, Natu, Cande con quienes elegí crecer hace tanto tiempo, por lo que fuimos y por lo que somos, por estar, por los consejos, por lo incondicionales, por ser las amigas que elijo día a día estén donde estén.

A mi familia, tíos, primos, porque no hay nada más lindo que una familia grande y unida.

A mis hermanos y cuñadas por estar cerca a pesar de estar lejos, por los domingos, por mis sobrinos (Juju, Tony, Valen y Nico) que son lo más lindo de este mundo.

A Guille, por escucharme, por acompañarme, por crecer conmigo, por ser mi contención, mi cable a tierra, por alentarme frente a la frustración, por creer en mí.

A mis padres que son los que siempre están, que brindan su amor incondicionalmente, que me escuchan, se preocupan, me apoyan, y por haberme enseñado tanto.

A todos, MUCHAS GRACIAS!!!!

ÍNDICE

RESUMEN **2**

PATHOPHYSIOLOGY AND THERAPY IN SOLID ORGAN TRANSPLANTATION **4**

AGRADECIMIENTOS **6**

ÍNDICE **7**

ABREVIATURAS **11**

INTRODUCCIÓN **13**

1. INHIBIDOR DE PROTEASAS LEUCOCITARIAS (SLPI) 13

1.1. Estructura y biosíntesis *13*

1.2. Modulación de la expresión de SLPI *14*

1.3. Funciones del SLPI *14*

2. TRASPLANTE DE ÓRGANOS SÓLIDOS VASCULARIZADOS Y LA PROBLEMÁTICA ACTUAL. 17

3. FACTORES CRÍTICOS PARA LA SUPERVIVENCIA DEL ÓRGANO TRASPLANTADO. 20

3.1. Compatibilidad de Complejo Mayor De Histocompatibilidad (CMH) y grupo ABO *20*

3.2. Tipos de donantes *22*

3.3. Factores de riesgo derivados del donante *23*

3.4. Factores de riesgo derivados del receptor *25*

3.5. Factores de riesgo perioperatorios *25*

4. DAÑO POR ISQUEMIA REPERFUSIÓN (IRI) 26

4.1. Daño en la fase de isquemia *27*

4.2. Daño en la fase de reperfusión *28*

4.3. Respuesta inmune en el daño por isquemia reperfusión *29*

4.3.1. Respuesta inmune innata 30

4.3.2. Respuesta inmune adaptativa 32

4.4. Síndrome de post-reperfusión *32*

5. DISFUNCIÓN DEL ÓRGANO EN EL POST-TRASPLANTE 33

5.1. Disfunción Renal Post-trasplante *34*

5.2. Disfunción Hepática Post-trasplante *34*

6. RECHAZO DEL ÓRGANO TRASPLANTADO 35

6.1. Mecanismos de activación de la respuesta alogénica *35*

6.1.1. Vía directa 35

6.1.2. Vía indirecta 36

6.1.3. Vía semi-directa 36

6.2. Mecanismos efectores del rechazo al aloinjerto ... *37*
6.2.1. Rechazo hiperagudo ... 37
6.2.2. Rechazo agudo ... 38
6.2.3. Rechazo crónico ... 39
7. ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS PARA FAVORECER LA SOBREVIDA DEL INJERTO. ... 39
7.1. Técnicas de conservación y líquidos de preservación ... *40*
7.2. Tratamientos farmacológicos para la prevención del IRI ... *42*
7.2.1. Ácido tióctico (ALA) como tratamiento para el IRI ... 42
7.3. Prevención del rechazo alogénico ... *44*
7.3.1. Drogas inmunosupresoras ... 45
8. MANEJO DEL PACIENTE POST-TRASPLANTE ... 48
9. BIOMARCADORES DE DAÑO ... 48

OBJETIVOS ... 50

MATERIALES Y MÉTODOS ... 51

1. COMITÉ DE ÉTICA ... 51
2. PROTOCOLO DE LOS ESTUDIOS RELACIONADOS A LA FUNCION RETRASADA DEL INJETO ... 51
2.1. Pacientes ... *51*
2.2. Microarreglo de biopsias de pacientes ... *53*
2.3. RT- qPCR ... *55*
3. PROTOCOLO DE USO DEL LÍQUIDO DE PERFUSIÓN ... 56
3.1. Pacientes ... *56*
3.2. Obtención de líquido de perfusión de órganos a trasplantar. ... *56*
4. PROTOCOLOS CLÍNICOS PARA LA PREVENCIÓN DEL DAÑO POR IRI ... 57
4.1. PROTOCOLO ÁCIDO A-LIPOICO EN PACIENTES TRASPLANTADOS RENOPANCREATICOS ... 57
4.1.1. Pacientes ... *57*
4.1.2. Citoquinas inflamatorias séricas ... *58*
4.1.3. Determinación de los niveles de SLPI plasmáticos ... *58*
4.1.4. Determinación de los niveles de PAP (Reg3a) ... *59*
4.1.5. RT- qPCR ... *59*
4.1.6. Evaluación Clínica ... *61*
4.2. PROTOCOLO ÁCIDO A-LIPOICO EN PACIENTES TRASPLANTADOS HEPÁTICOS ... 61
4.2.1. Pacientes ... *61*
4.2.2. RT- qPCR ... *63*
4.2.3. Medición de los niveles de SLPI y PAP (reg3a) plasmáticos. ... *65*
4.3. PROTOCOLO ÁCIDO A-LIPOICO EN PACIENTES TRASPLANTADOS RENALES ... 65

4.3.1. Pacientes ... *65*
5. MODELOS ANIMALES DE DAÑO POR ISQUEMIA-REPERFUSIÓN ... 67
5.1. Animales ... *67*
5.2. Procedimiento quirúrgico ... *67*
5.3. Grupos experimentales ... *67*
5.4. Análisis de urea y creatinina plasmática ... *68*
5.5. Histopatología renal ... *68*
5.6. Análisis de RT- qPCR ... *68*
6. MODELO ANIMAL DE DAÑO RENAL POR GENTAMICINA ... 69
6.1. Animales ... *69*
6.2. Protocolo experimental ... *70*
7. ROL DE SLPI EN PACIENTES TRASPLANTADOS RENALES ... 70
7.1. Obtención de plasma de pacientes ... *70*
7.2. Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) ... *71*
7.3. Ensayos de proliferación celular ... *71*
7.4. Aislamiento de monocitos a partir de CMSP ... *71*
8. CULTIVO DE LÍNEAS CELULARES ... 72
8.1. Ensayo de apoptosis celular ... *72*
8.2. Ensayo de MTT ... *72*
8.3. Microarreglo de muerte celular ... *72*
9. PRODUCCIÓN DE SLPI RECOMBINANTE HUMANO ... 74
9.1. Expresión de SLPI ... *74*
9.2. Purificación de SLPI ... *74*
9.3. Detección del SLPI mediante SDS-PAGE. ... *75*
9.4. Diálisis del SLPI y elusión por polimixina b ... *75*
9.5. Cuantificación de la concentración de proteína ... *76*
9.6. Actividad antiserinproteasa ... *76*
10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO ... 77

RESULTADOS ... 78

1. EVALUACIÓN DE MEDIADORES INFLAMATORIOS EN EL RETRASO EN LA FUNCIÓN DEL INJERTO ... 78
1.1. Niveles diferenciales de ARNm en biopsias renales de pacientes trasplantados con y sin DGF ... *78*
1.2. Factores de riesgo asociados a los niveles de transcripto. ... *80*
1.3. Características clínicas de pacientes con y sin DGF asociadas a los niveles de transcripto. ... *82*
2. EL SLPI COMO BIOMARCADOR EN EL LÍQUIDO DE PERFUSIÓN ... 84
3. PROTOCOLOS CLÍNICOS PARA LA PREVENCIÓN DEL DAÑO POR ISQUEMIA-REPERFUSIÓN. ... 88

3.1. USO DEL ALA EN PACIENTES TRASPLANTADOS RENOPANCREÁTICOS 89
3.1.1. Expresión de mediadores inflamatorios en biopsias de pacientes trasplantados. 90
3.1.2. Expresión de mediadores inflamatorios en plasma de pacientes trasplantados 90
3.1.3. Evaluación funcional de los órganos 93
3.1.4. Evolución clínica de los pacientes 96
3.2. USO DE ALA EN PACIENTES TRASPLANTADOS HEPÁTICOS 97
3.2.1. Niveles de ARNm de mediadores en biopsias hepáticas 98
3.2.2. Expresión de mediadores inflamatorios en plasma de pacientes trasplantados 99
3.2.3. Evolución clínica de los pacientes 101
3.3. USO DEL ALA EN PACIENTES TRASPLANTADOS RENALES 102
4. EFECTO DEL SLPI EN MODELOS DE DAÑO RENAL 105
5. ROL DE SLPI EN PACIENTES TRASPLANTADOS RENALES 109
5.1. Determinación del SLPI en biopsias de pacientes trasplantados 109
5.2. Determinación del SLPI en plasma de pacientes trasplantados 111
5.3. Actividad funcional del SLPI en leucocitos derivados de pacientes trasplantados. 113
5.4. Actividad funcional del SLPI en células epiteliales renales 115
5.5. Factores inductores de SLPI en pacientes trasplantados 120
5.6. El SLPI plasmático como biomarcador de daño o protección 122

DISCUSIÓN 125

1. Expresión de marcadores inflamatorios en pacientes trasplantados con o sin DGF. 125
2. Biomarcador del estado del órgano a trasplantar en el líquido de perfusión. 128
3. Intervención terapéutica para reducir el DGF y el SPR 130
4. Administración de SLPI en modelos animales de daño renal. 135
5. Función de SLPI en trasplantes renales humanos. 136

CONCLUSIONES 141

BIBLIOGRAFÍA 143

Abreviaturas

ADHL: ácido dihidrolipoico

ADNc: ADN copia

ALA: Ácido lipoico

ANOVA: Análisis de varianza

ARNm: ARN mensajero

ATP: Adenosín tri-fosfato

c.p.m: Cuentas por minuto

C3: proteína del complemento

C3a: fracción a de la proteína C3

CD: Célula dendrítica

CD14: *Cluster* de diferenciación 14

CMH: Complejo Mayor de Histocompatibilidad

CPA: Célula presentadora de antígeno

D.O.: Densidad óptica

DAMPs: Patrones moleculares asociados a daño

DCE: Donante de criterio expandido

DCS: Donante de criterio estándar

DGF: *Delay Graft Function* - Retraso en la función del injerto

ELISA: Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima

EROs: Especies reactivas del oxígeno

HIF: Factor inducible por hipoxia

HIV: Virus de la inmunodeficiencia humana

HLA: Antígenos leucocitarios humanos

HMOX-1: Hemoxigenasa 1

IL: Interleuquina

IL-1R1: Receptor de interleuquina 1 tipo 1

INF-δ: Interferon gamma

IRI: Daño por isquemia-reperfusión

LPS: Lipopolisacárido

MPH: Máquina de perfusión hipotérmica

NF-kB: Factor nuclear kappa B

NTA: Necrosis tubular aguda

PAP: proteína asociada a pancreatitis

PBMCs: Células mononucleares de sangre periférica

PHD: Prolil hidroxilasa

PMNs: Leucocitos polimorfonucleares

Rpm: Revoluciones por minuto

RT- qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcripción inversa

SBF: Suero bovino fetal

SD: desvío estándar

SEM: Error estándar de la media

SLPI: Inhibidor secretorio de proteasas leucocitarias

SLPIrh: Inhibidor secretorio de proteasas leucocitarias recombinante humano

SPR: Síndrome de post-reperfusión

TCR: Receptor de linfocito T

TGFβ: Factor de crecimiento transformante beta

Th1: T *helper* 1

Th2: T *helper* 2

TIF: tiempo de isquemia fría

TNF-α: Factor de necrosis tumor

TRP: Trasplante Reno-Pancreático

VHC y VHB: Virus del Herpes C - Virus del Herpes B

WAP: *Whey acid protein*

Introducción

1. INHIBIDOR DE PROTEASAS LEUCOCITARIAS (SLPI)

1.1. Estructura y biosíntesis

El SLPI es una proteína pequeña, catiónica, no glicosilada e hidrofóbica de 11,7 kDa y 107 aminoácidos[1]. Forma parte de la familia de proteínas WAP (*Whey Acid Protein*). Se encuentra codificada en el cromosoma 20q12-13.1 en los seres humanos y en el cromosoma 2H en ratones con una configuración de exón-intrón similar en ambas especies[2]. El gen del SLPI humano consiste de cuatro exones y tres intrones[3].

La secuencia de aminoácidos del SLPI genera una proteína con dos dominios altamente homólogos de 53 y 54 aminoácidos cada uno (Figura 1). Cada dominio contiene ocho residuos de cisteína que forman 4 puentes disulfuro, los cuales estabilizan la estructura de la molécula, dándole apariencia de "boomerang"[4]. Estos dominios ricos en cisteína son también llamados dominios WAP 1 (carboxilo terminal) y WAP 2 (amino terminal).

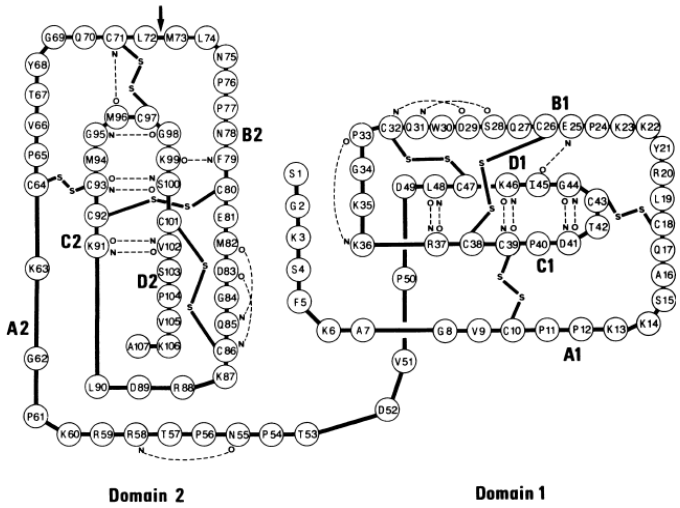


Figura 1: Representación esquemática del arreglo de la cadena polipeptídica del SLPI y sus conexiones por puente disulfuro. Los principales puentes de hidrógeno intracatenarios están graficados por líneas punteadas.

Esta proteína es secretada por diversos tipos celulares, encontrándose presente en forma constitutiva en la mayoría de los fluidos extravasculares que limitan mucosas. En el pulmón, el SLPI es producido por las glándulas serosas de la tráquea y por las células de clara bronquial. En el tracto genital masculino y femenino, se encuentra en el plasma

seminal y en la mucosa cervical respectivamente. Además, el SLPI es producido por las células epiteliales de glándulas parótidas, epitelio intestinal, túbulo renal, queratinocitos, por las células beta del páncreas, así como también es producido por células efectoras del sistema inmune, incluyendo los mastocitos, neutrófilos y macrófagos. La síntesis de SLPI por las células inflamatorias genera niveles sustanciales de dicha proteína en los focos inflamatorios de enfermedades inflamatorias crónicas como la artritis, el asma y la psoriasis[5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14].

1.2. Modulación de la expresión de SLPI

La producción del SLPI se encuentra modulada por distintas moléculas y factores. Se ha demostrado que LPS, IL-1, TNF-α, IL-6, elastasa neutrofílica y defensinas son capaces de inducir la producción del SLPI[15, 16, 17], por el contrario citoquinas antiinflamatorias y de remodelamiento tales como TGF-β pueden disminuir su producción[16, 17,18,18]. Sin embargo, se ha observado que una citoquina proinflamatoria característica del perfil Th1, como el IFN-γ es capaz de inhibir la expresión del SLPI inducida por LPS en macrófagos[19]. Por otra parte, la IL-4, citoquina antiinflamatoria patognomónica del perfil Th2, aumenta la expresión del SLPI en líneas celulares *in vitro* [19]. Estos trabajos sugieren que los niveles de expresión del SLPI se encuentran rigurosamente regulados y que es altamente dependiente del entorno local.

1.3. Funciones del SLPI

El SLPI posee un péptido señal que permite su secreción, sin embargo, debido a su carga neta positiva, se cree que también puede ingresar tanto a la célula como al núcleo atravesando las membranas [20, 21]. Por otro lado, se han postulado dos receptores de membrana que podrían mediar su ingreso a la célula, llamados anexina A2 y escramblasa fosfolípido 1[22, 23]. El hecho de ser una proteína secretoria y tener capacidad de ingresar a la célula diana nos permite comprender la amplia variedad de funcionalidades descriptas a continuación.

La primera función identificada fue la de inhibidor de proteasas, entre ellas la elastasa neutrofílica, la catepsina G, la tripsina y la quimiotripsina. Como posee dos dominios en su estructura, inicialmente se postuló que en ambos se encontraría un sitio inhibitorio[1]. Sin embargo, estudios posteriores donde se evaluó la actividad inhibitoria de cada

dominio usando modificaciones químicas o mutaciones de residuos críticos, mostraron que la unión 1:1 con las proteasas ocurre a través del dominio 2 (carboxilo terminal) y es clave en este proceso la leucina 72 (Leu72); mientras que el dominio 1 probablemente no tenga actividad inhibitoria[24]. La gran afinidad del SLPI por la elastasa neutrofílica y su alta concentración local, por ejemplo, en el compartimiento bronquial (cerca de 5 μM), sugieren que su principal función fisiológica es regular cualquier actividad excesiva de las serín proteasas controlando la proteólisis y así previniendo la destrucción del tejido. Dicha función también explicaría los altos niveles encontrados en sitios de inflamación siendo fundamental para la regulación de la respuesta inflamatoria[25, 26]. Se cree que la disrupción del balance entre proteasas e inhibidores es responsable de la degradación de la matriz extracelular y del daño tisular, en particular en enfermedades pulmonares tales como la fibrosis quística[27].

Otra de las funciones del SLPI, es su actividad microbicida tanto *in vivo* como *in vitro*[28, 29]. Recientemente se demostró su actividad antibacteriana contra *M. tuberculosis* y fue descripto como un receptor de reconocimiento de patrones, que no solo mata al microorganismo, sino que también favorece su fagocitosis por macrófagos[29, 30]. Hiemstra *et al* demostró que el SLPI nativo o su dominio amino terminal tienen capacidad de matar bacterias como *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. En tanto, el dominio carboxilo terminal tiene una menor capacidad bactericida, indicando que dicha actividad reside principalmente en el dominio WAP 1. Sin embargo, ambos dominios tendrían capacidad microbicida, ya que como sucede con otros péptidos catiónicos como las defensinas, los residuos con carga positiva serían los responsables de la disrupción de la membrana de los microorganismos[31, 32]. También se describió actividad anti fúngica contra *Aspergillus fumigatus* y *Candida albicans*[11]. Pero sin duda alguna, el SLPI adquirió relevancia al identificarse su actividad selectiva anti-viral contra el virus del HIV humano. La investigación de la actividad inhibitoria anti-HIV-1 de la saliva humana, llevó a la identificación del SLPI como el factor responsable[33]. Sin embargo, parece ser que dicha actividad es independiente de sus propiedades antiproteasas y no resulta de una interacción directa con el virus; sino más bien de interacciones con las células huésped[23]. Las actividades antimicrobianas del SLPI serían relevantes a nivel de las mucosas ya que, como fue mencionado previamente, las concentraciones fisiológicas detectadas son muy elevadas en varios fluidos corporales[11, 31].

El SLPI también posee actividad antiinflamatoria independientemente de su actividad anti-proteasa. Henriksen *et al* demostró que la sobreexpresión del SLPI inhibe al factor

nuclear- κB (NF-κB), un factor de transcripción que induce la expresión de varios mediadores proinflamatorios[34]. Uno de los mecanismos postulados para dicha actividad describe que el SLPI impide la degradación mediada por proteosoma de varios factores regulatorios de la actividad de NF-κB tales como IκBα, IκBβ e IRAK frente a un estímulo proinflamatorio[35, 36]. La inhibición de la degradación de IkB previene la liberación de NF-kB evitando su entrada al núcleo y la activación de la transcripción de genes tales como IL-8 y TNF-α. Posteriormente, un segundo mecanismo de acción propuesto fue que el SLPI se uniría a regiones regulatorias dianas del NF-κB impidiendo así su función[20]. Independientemente del modo de acción, se ha demostrado experimentalmente su actividad antiinflamatoria en varios órganos. Dicha actividad, a su vez, está relacionada con la modulación de la expresión de citoquinas. Por ejemplo, se pudo observar que los macrófagos tratados con LPS y SLPI aumentan la expresión de citoquinas antiinflamatorias tales como el TGF-β e IL-10 y disminuyen la expresión de TNF-α[37, 38].

Otra de las funciones más relevantes del SLPI ha sido su participación en la cicatrización de heridas[39, 40, 41]. De hecho, fue presentada una solicitud de patente para ser utilizada en heridas que tienen grandes dificultades para cicatrizar como por ejemplo las úlceras en diabéticos.

Todas estas actividades del SLPI, han sido demostradas en una serie de modelos experimentales. Por ejemplo se evidenció que el SLPI atenúa la respuesta inflamatoria aguda causada por la deposición de complejos inmunes de IgG en pulmón, y que reduce el daño autoinmune en un modelo experimental de orquitis así como también es capaz de inhibir la fagocitosis de neutrófilos y el estallido oxidativo inducido en un modelo de artritis[42, 43, 44].

Como se puede observar, existe una amplia literatura con respecto a las actividades del SLPI con respecto a la respuesta inmune innata. Sin embargo, es mucho menos lo que se sabe del SLPI en la respuesta inmune adaptativa. Al respecto, recientemente en nuestro laboratorio, hemos descripto que el SLPI tiene la capacidad de inhibir la proliferación linfocitaria de células $CD4^+$ [45]. Por otra parte, se ha propuesto al SLPI como un modulador de la activación de células dendríticas y la subsecuente respuesta de células T en ganglios linfáticos drenantes de mucosas[46].

A pesar de su conocida actividad antiinflamatoria pocos trabajos describen el rol del SLPI en el ámbito de la problemática de los trasplantes de órganos. En un modelo experimental de daño por isquemia reperfusión (IRI) hepática, se observó que el SLPI exógeno alivia el daño reduciendo la producción de citoquinas y quimiocinas, así como

también el reclutamiento de neutrófilos. A su vez, se determinó un aumento de la expresión endógena del SLPI en el tejido hepático, sugiriendo como función la regulación de la respuesta inflamatoria[47]. Por otro lado, se ha descripto un efecto protector del SLPI incluido en la solución de preservación en un modelo de trasplante cardiaco [48]. Otros en cambio, han postulado la determinación del SLPI como un potencial biomarcador del daño agudo renal en el post-trasplante[49]. A pesar de estos pocos, pero interesantes antecedentes, el rol del SLPI endógeno no ha sido determinado en el contexto clínico del trasplante de órganos sólidos estable, y es precisamente este aspecto uno de los objetivos más relevantes de esta tesis de trabajo.

2. TRASPLANTE DE ÓRGANOS SÓLIDOS VASCULARIZADOS Y LA PROBLEMÁTICA ACTUAL.

El trasplante de órganos sólidos consiste en el reemplazo de un órgano vital enfermo sin posibilidad de recuperación por otro sano. Actualmente, se estima que el número total de trasplantes de órganos sólidos efectuados en el mundo en el año 2014, fue de 119.873. Esto representa un aumento cercano al 1,8% respecto al año 2013. Del total de trasplantes efectuados, 79.948 corresponden a trasplantes de riñón, 26.151 a hígado, 6.542 a corazón, 4.689 a pulmón, 2.328 a páncreas y 215 a intestino delgado (Datos del Observatorio Mundial de la OMS - ONT sobre donación y trasplante).

En nuestro país, según información del INCUCAI (El Instituto Nacional Central Único Coordinador de Ablación e Implante), en el año 2015 se trasplantaron 1.868 pacientes, de los cuales 1.465 pacientes fueron trasplantados con órganos provenientes de donantes fallecidos y 403 con órganos provenientes de donantes vivos. Un análisis minucioso del tipo de órganos trasplantados, indican un total de 1.249 trasplantes renales; 382 hepáticos; 114 cardíacos; 74 pulmonares; 47 pancreáticos y 2 de intestino (Tabla 1). Algunos de estos trasplantes fueron multiorgánicos, es decir hepatorrenales, renopancreáticos y cardiopulmonares.

ÓRGANO	TRASPLANTES con Donante Fallecido	TRASPLANTES con Donante Vivo Relacionado	Total TRASPLANTES	Tasa de TRASPLANTE PMH
Riñón 787 Renal - 71 Renopancreas - 16 Hepatorrenal - 7 Cardiorrenal	881	368	1.249	28,96
Hígado 331 Hígado - 16 Hepatorrenal	347	35	382	8,86
Corazón 106 Corazón - 1 Cardiopulmonar - 7 Cardiorrenal	114	0	114	2,64
Pulmón 46 Pulmón - 1 Cardiopulmonar	47	0	47	1,09
Páncreas 3 Páncreas - 71 Renopáncreas	74	0	74	1,72
Intestino	2	0	2	0,05
Total	1.465	403	1.868	43,31

Tabla 1: Tipos de órganos trasplantados y número de trasplantes realizados con donante vivo y donante fallecido. Población año 2015: 43.131.966. Fuente: INCUCAI.

Para el mismo año (2015), los pacientes en lista de espera fueron 7.765 (Tabla 2). La gran brecha que se observa entre la cantidad de pacientes en lista de espera y la cantidad de trasplantes realizados, evidencia un grave problema de salud pública, donde existe una demanda insatisfecha. Este problema, a diferencia de otros en salud pública, no se debe a la falta de recursos económicos, sino a la baja disponibilidad de órganos y de donantes.

Los órganos trasplantados presentan problemáticas comunes y particulares según el tipo de órgano. En la introducción de esta tesis, detallaremos algunas problemáticas comunes a los trasplantes, pero nos avocaremos especialmente a la problemática de tres tipos de trasplantes de órganos sólidos vascularizados, que son el trasplante renal, hepático y renopancreático.

LISTA DE ESPERA PARA TRASPLANTE| órganos

MODALIDAD	PACIENTES REGISTRADOS
Renal	6.066
Renopancreas	129
Hepática	1.216
Hepatorrenal	26
Hepatointestinal	1
Cardíaca	111
Cardiopulmonar	7
Cardiorrenal	2
Pulmonar	183
Páncreas	13
Intestinal	11
TOTAL	7.765

Tabla 2: Número de pacientes en lista de espera según el tipo de órgano con necesidad de trasplante. Fuente: INCUCAI

El riñón es el órgano sólido vascularizado más trasplantado en Argentina y a nivel mundial. Este procedimiento es en la actualidad y desde hace años la terapia de elección para la mayoría de las causas de insuficiencia renal crónica[50]. En estos pacientes, el trasplante mejora la calidad de vida al prescindir de la dependencia de diálisis y de las dietas rigurosas, y a su vez aumenta la sobrevida. Además, en comparación con la diálisis, es el tratamiento más económico a largo plazo.

Otro tipo de trasplante por ejemplo, es el simultáneo de riñón y páncreas (TRP) que suele estar indicado en pacientes diabéticos con falla renal terminal, dado que mejora la salud y la expectativa de vida del paciente[51, 52]. Los beneficios del TRP y, por tanto, la base de su aceptación como un procedimiento terapéutico apropiado incluyen, una mejora de la calidad de vida del paciente; la prevención de la nefropatía diabética recurrente; la independencia de insulina inyectable, menores restricciones dietéticas; menor monitorización de la glucosa; y la estabilización o mejora de la neuropatía y retinopatía[53, 54]. Además, la inmunosupresión es la misma para ambos órganos, por lo cual no se requieren drogas inmunosupresoras adicionales.

Con respecto al trasplante hepático, es la terapéutica estándar para pacientes con enfermedad hepática terminal y algunos tipos especiales de tumores. En el año 2015,

1243 pacientes se encontraban en lista de espera para trasplante hepático en Argentina; sin embargo, sólo 382 órganos fueron procurados durante ese año (INCUCAI). A diferencia del trasplante renal donde el órgano se implanta en el receptor sin remoción de sus riñones, el trasplante de hígado ortotópico implica la remoción íntegra del órgano nativo y su reemplazo por el injerto en la localización anatómica normal. Es importante destacar que, los pacientes con necesidad de trasplante por ejemplo aquellos con falla hepática terminal, a diferencia de los pacientes con falla renal terminal, no poseen una máquina de soporte que mejore la calidad de vida y la única alternativa terapéutica es el trasplante.

3. FACTORES CRÍTICOS PARA LA SUPERVIVENCIA DEL ÓRGANO TRASPLANTADO.

Como se dijo previamente, el trasplante mejora la sobrevida de los pacientes con enfermedades terminales[55]. Este beneficio proporcionado por el nuevo órgano trasplantado hace que el objetivo primordial sea optimizar la sobrevida del mismo. Para ello, resulta fundamental evaluar factores pre-trasplante que puedan influir en el funcionamiento del órgano a corto y largo plazo. En este sentido, no cabe duda que uno de los factores más importantes, es la histocompatibilidad del sistema HLA. También han sido descriptos factores relacionados al receptor o al donante que influyen en la sobrevida del órgano. Entre los factores derivados del donante podemos mencionar la compatibilidad de grupo sanguíneo, la edad y la causa de muerte. En tanto que los derivados del receptor incluyen la edad, el tiempo en diálisis (para trasplantes renales), su estado de sensibilización frente a los antígenos del donante, entre otros [56]. También existen factores peritrasplante que pueden afectar la función del órgano, tales como el tiempo prolongado de isquemia fría, el tiempo de sutura, entre otras. A continuación, se detallan algunos aspectos de los factores críticos más relevantes.

3.1. Compatibilidad de Complejo Mayor De Histocompatibilidad (CMH) y grupo ABO

El éxito o el fracaso de un trasplante, depende en gran medida de la relación genética entre donante y receptor, ya que existen moléculas que marcan la diferencia entre lo

propio y lo no propio. Estas moléculas denominadas Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) se ubican en la superficie de todas las células del organismo y se encuentran codificadas por un conjunto de genes, que en los humanos corresponde al llamado sistema HLA (*Human Leukocyte Antigens*). Este conjunto de genes se encuentra en el brazo corto del cromosoma 6 y son altamente polimórficos. Cada individuo hereda los alelos de CMH del padre y de la madre, y al conjunto de alelos heredados se lo denomina haplotipo. Un aspecto muy importante, es que su expresión es codominante, es decir, que se expresan en la membrana celular todos los alelos heredados.

Existen tres clases de moléculas de HLA. Los genes de clase I, denominados HLA–A, –B y –C, son expresados en la mayoría de las células nucleadas y plaquetas, de forma tal que constituyen el mayor blanco para las reacciones inmunes contra el injerto. A diferencia de los genes de clase I, los de clase II (HLA–DP, –DQ y –DR) se encuentran expresados solamente en las células presentadoras de antígenos profesionales. Por último, los genes de clase III codifican para algunas proteínas que intervienen en la respuesta inmune como factores del sistema de complemento o proteínas de shock térmico[57]. La presencia en los órganos injertados de moléculas HLA distintas a las del receptor (situación de incompatibilidad HLA) provoca en éste una respuesta del sistema inmune que puede resultar en el rechazo del órgano, el cual puede ser mediado por anticuerpos y/o por células T. Por otra parte, si las moléculas HLA presentes en el órgano injertado son iguales a las del receptor (situación de compatibilidad HLA), se reduce en gran medida la incidencia y la severidad del rechazo, aumentando por tanto la sobrevida del injerto. Los mecanismos que llevan a activación del sistema inmune y al rechazo del órgano serán desarrollados más adelante.

Además de la compatibilidad del sistema HLA, también es muy importante determinar la compatibilidad del grupo sanguíneo ABO. Dado que los antígenos del grupo sanguíneo se encuentran en muchas células, incluyendo eritrocitos, plaquetas y células endoteliales de todos los órganos vasculares, la incompatibilidad ABO es una barrera inmunológica significativa en el trasplante. Esto es debido a la presencia de anticuerpos naturales contra los antígenos A y/o B. Los pacientes con grupo sanguíneo A poseen anticuerpos contra el antígeno B y viceversa, mientras que los pacientes del grupo 0 poseen anticuerpos contra ambos antígenos. Solamente el grupo AB no produce este tipo de anticuerpos dado que posee naturalmente ambos antígenos[58]. Si el donante y receptor poseen incompatibilidad ABO, puede ocurrir rechazo agudo humoral. Por ejemplo, en

trasplantes hepáticos ABO incompatibles, se ha reportado un mayor riesgo de rechazo humoral y celular, trombosis arterial y complicaciones biliares post-trasplante [59].

3.2. Tipos de donantes

Los órganos a trasplantar pueden provenir de donantes vivos o cadavéricos. Los donantes vivos son aquellos que pueden realizar la donacion de un órgano y sobrevivir luego del procedimiento. Existen principalmente dos tipos de donantes vivos. Los donantes vivos relacionados, que deben tener un vínculo parental hasta 4º grado con el receptor y los no relacionados, quienes no se encuentran emparentados con el receptor. Es interesante señalar que en Argentina, este último tipo de donación esta prohibido por ley; por lo tanto, sólo es posible realizarla con autorización judicial.

En el caso de los donantes cadavéricos, existen dos tipos: aquellos con muerte encefálica y los donantes cadavéricos a corazón parado. Los donantes con muerte encefálica son pacientes que no poseen ninguna actividad cerebral y que indefectiblemente van a sufrir paro cardíaco, dado que la respiración se mantiene de forma artificial, asÍ como también el funcionamiento cardíaco mediante el uso de drogas. En la Argentina, sólo se utilizan donantes cadavéricos con muerte encefálica, siendo un tema de discusión actual, la posibilidad de incrementar el número de donantes incorporando a los donantes cadavéricos a corazón parado.

Los requisitos para que un individuo con muerte encefálica pueda ser considerado un potencial donante son bastante estrictos, y tiene en cuenta la edad, la presencia de comorbilidades como la hipertensión arterial, alteraciones hidroelectrolíticas, entre otras. Sin embargo, la necesidad de aumentar el número de donantes, hizo reevaluar esos criterios. Es así, como en algunos centros se comenzó a utilizar a donantes cadavéricos con criterios expandidos (DCE). Las características de estos donantes incluyen una edad > 60 años, o edad 50-59 años con algunas de estas características: diabetes o hipertensión arterial, con trastornos hidroelectrolíticos o hemodinámicos graves, con serología positiva para el virus hepatitis, que ha fallecido por intoxicación, con antecedente de neoplasias malignas, quemados, infectados y hospitalizaciones prolongadas (más de siete días en la UTI). Los criterios de órganos expandidos, que en un principio sólo se aplicaban a riñón, se han ido extendiendo a otros órganos, en la medida en que las listas de espera divergen cada vez más entre receptores potenciales y donantes, por lo que se han incorporado al trasplante de hígado, páncreas, corazón,

pulmón, intestino delgado y tejidos. A pesar de no ser donantes ideales, los receptores de riñones de DCE demostraron tener una tasa de sobrevida mayor en comparación con los pacientes con enfermedad renal terminal en lista de espera, permitiendo aumentar el número de trasplantes[60].

Particularmente en el caso de trasplante hepático, como es un órgano con capacidad regenerativa, también existe la donación mediante técnica de partición hepática (un solo hígado cadavérico se utiliza en dos pacientes) o técnica de reducción hepática (un segmento de órgano adulto se implanta en un receptor pediátrico).

3.3. Factores de riesgo derivados del donante

La adecuada función del órgano a trasplantar es un factor sumamente importante para la sobrevida del injerto una vez trasplantado. Se han descripto condiciones del donante que repercuten de manera negativa en la sobrevida del órgano post-trasplante. Esto obligó a establecer ciertos criterios de exclusión de donantes. Entre los factores que influyen de manera negativa, uno de los más relevantes es la edad. Órganos provenientes de pacientes añosos suelen tener peor pronóstico en comparación con aquellos procedentes de pacientes jóvenes [61, 62]. Otro de los factores que condicionan la evolución del trasplante es el tipo de donante, riñones provenientes de donantes vivos tienen mayor sobrevida que aquellos derivados de donantes cadavéricos.

Por otra parte, se han identificado enfermedades preexistentes en los donantes que pueden afectar el resultado global del trasplante. Es difícil determinar completamente las relaciones causales ya que todos estos factores (la edad, la diabetes, la enfermedad vascular, la obesidad) están vinculados. Sin embargo, todos estos por separado, o juntos, pueden afectar el funcionamiento del órgano y su recuperación. Es decir, la salud general del donante es crítica para el futuro del trasplante. Como ya se nombró, aquellos pacientes que reciben órganos de DCE podrían estar recibiendo un órgano proveniente de un donante hipertenso, este tipo de enfermedades sistémicas pueden conducir por ejemplo a insuficiencia renal por daño parenquimatoso, disminuyendo la sobrevida del injerto renal. En la Figura 2 se puede observar como disminuye la sobrevida del injerto en los meses post-trasplante según si el órgano trasplantado proviene de un donante con o sin hipertensión[63].

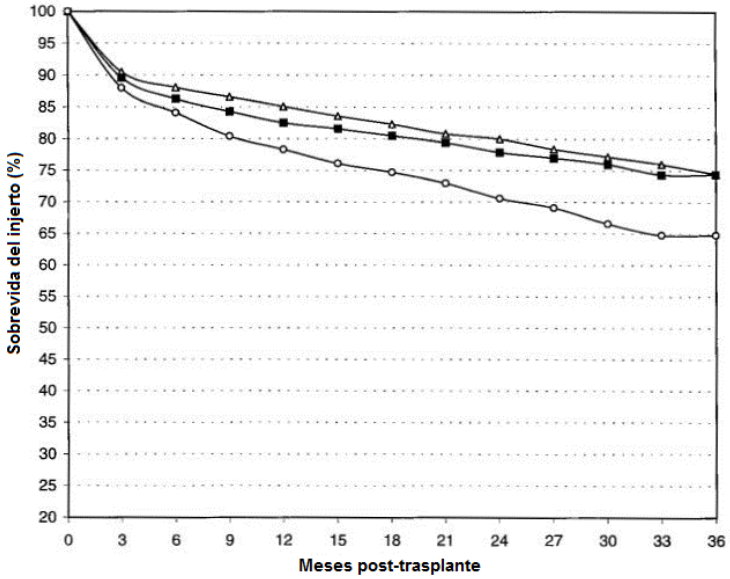


Figura 2: Sobrevida del injerto según la duración y presencia de hipertensión en el donante. Donantes sin hipertensión (Δ), que sufren hipertensión de 1 a 10 años (■), órganos provenientes de donantes con más de 10 años de hipertensión (o). Fuente: Ojo AO, Am J Kidney Dis, 2000.

Otra manera de poner en evidencia la importancia de los factores de riesgo del donante, es comparando a los DCE con los donantes de criterio estándar (DCS) en lo que respecta a la sobrevida del injerto y del paciente. En la Tabla 3 se puede observar que los órganos obtenidos de los DCS tienen mayor sobrevida que aquellos procedentes de criterio expandido, así también los pacientes[64].

Tiempo de sobrevida	Sobrevida del paciente		Sobrevida del injerto	
	DCE (%)	DCS (%)	DCE (%)	DCS (%)
3 meses	96,0	97,5	90,4	94
1 año	90,6	94,5	81,7	89,3
3 años	78,5	89,9	65,1	80,4
5 años	69,9	81,2	48,6	65,2

Tabla 3: Sobrevida del aloinjerto renal y del paciente tras trasplante con DCE o DCS a lo largo del tiempo post-trasplante (de 3 meses a 5 años). Editado de Metzger, Am J Transplant., 2003.

Por otra parte, se sabe que infecciones transmitidas por el donante al receptor pueden tener importantes influencias sobre el resultado del trasplante. Por ejemplo, la infección por citomegalovirus (CMV), especialmente cuando se transmite a un receptor que nunca ha estado expuesto, aumenta el riesgo para infecciones fúngicas, rechazo y se asocia con peor sobrevida del paciente[65]. Sin embargo, el desarrollo de profilaxis y regímenes

preventivos ha limitado significativamente los efectos nocivos. Otro caso es el del virus Epstein-Barr, cuyo contagio puede plantear un riesgo de enfermedad linfoproliferativa post-trasplante y la muerte del receptor[66].

Debido a todos estos factores mencionados, resulta fundamental la selección cuidadosa de los donantes, pero teniendo en cuenta que, frente a la falta de órganos ideales, es preferible el trasplante por sobre la continuidad en lista de espera, tanto en términos de calidad de vida, complicaciones y la sobrevida del paciente a largo plazo.

3.4. Factores de riesgo derivados del receptor

Con lo que respecta al receptor, también existen diversos factores de riesgo, entre ellos la edad. Se conoce que receptores añosos suelen tener menor sobrevida del injerto y del paciente en comparación con receptores jóvenes[62]. La obesidad es otro factor importante. En varios trabajos se sugiere que los pacientes obesos son más propensos a tener complicaciones quirúrgicas y post-quirúrgicas, y mayor morbilidad perioperatoria que los pacientes no obesos[67]. Las infecciones crónicas en el receptor también son factores de riesgo para la sobrevida del paciente en el post-trasplante. Por ejemplo, la infección con el virus de la hepatitis C y B (VHC, VHB), se asoció con un riesgo aproximadamente 2 veces mayor de mortalidad post-trasplante[68]. Forman L.M. *et al*, determinó que receptores de trasplantes hepáticos con infección crónica de VHC mostraban menor sobrevida del injerto y del paciente a largo plazo, en comparación con pacientes que recibían trasplantes debido a otras causas de enfermedad hepática terminal[69].

Por otro lado, cada tipo de trasplante tiene factores de riesgo propios, en el caso de trasplante renal, por ejemplo, se observó que los pacientes que permanecieron períodos prolongados en diálisis sufren un impacto negativo en el resultado post-trasplante y en la sobrevida del paciente[70].

3.5. Factores de riesgo perioperatorios

No solo las características de los individuos participantes del trasplante son factores de riesgo para el trasplante. Existen otros factores que son independientes del donante y del receptor. Entre ellos figura la isquemia del órgano como uno de los factores más críticos que influye de manera negativa en la función del órgano trasplantado. Durante el proceso de procuración, el órgano es ablacionado, lo que significa la interrupción sanguínea y la

consiguiente isquemia del órgano. Este órgano isquémico, luego es conservado en frío para su trasporte hasta la implantación en el receptor.

En el proceso de ablación, el órgano pasa por dos etapas de isquemia; la caliente y fría. La isquemia caliente ocurre en dos momentos diferentes durante el trasplante. El primer evento de isquemia caliente se inicia cuando los vasos del donante son pinzados y termina cuando se perfunde el órgano con la solución de preservación fría (normalmente unos pocos minutos). El segundo evento de isquemia caliente ocurre al colocar el órgano en el receptor hasta completar la anastomosis vascular e iniciar la perfusión por parte del receptor (alrededor de 35 minutos idealmente menos). La isquemia fría, transcurre desde que el órgano es ablacionado y se perfunde con solución de preservación fría, hasta el momento que el órgano es colocado en el receptor. El tiempo total de isquemia fría debería ser menor de 24 horas. Durante este período, el órgano es almacenado a 4ºC, lo que permite una disminución del metabolismo, sin cristalización de las proteínas[71]. De esta forma, el tiempo de isquemia caliente se vincula al proceso quirúrgico mientras que la isquemia fría está relacionada con el operativo de trasporte del órgano y la evaluación de compatibilidad con los potenciales receptores. Un tiempo de isquemia prolongado tanto fría como caliente se asocia con efectos adversos *a posteriori*, dado que puede afectar la función temprana del injerto, así como disminuir la sobrevida del injerto y el paciente a largo plazo[72, 73, 74, 75]. Desafortunadamente en nuestro país el tiempo de isquemia fría (TIF) suele ser elevado.

4. DAÑO POR ISQUEMIA REPERFUSIÓN (IRI)

Además de los factores de riesgo ya mencionados, durante el procedimiento quirúrgico los órganos trasplantados sufren el llamado daño por isquemia-reperfusión, el cual es una condición patológica inevitable caracterizada por la restricción inicial del suministro de sangre al injerto, seguido de la posterior restauración de la perfusión con la reoxigenación concomitante. La injuria comienza por anoxia, prosigue y se agrava al reperfundirse el órgano, culminando con una reacción inflamatoria estéril[76]. La duración de la isquemia determina la gravedad del daño tisular[77]. Debido a la isquemia, ocurren cambios estructurales y metabólicos en el tejido como la reducción del diámetro capilar, la disfunción metabólica de las células endoteliales, la disfunción de la membrana celular y la regulación positiva de mediadores proinflamatorios[78]. Una vez que se restablece el flujo

sanguíneo, se desencadenan una serie de mecanismos moleculares que pueden provocar la muerte de las células del tejido. A continuación, se detallan los procesos que resultan en la alteración funcional y estructural del tejido.

4.1. Daño en la fase de isquemia

En la fase isquémica, la lesión anóxica de las células O_2-dependientes es sin duda el proceso predominante[79, 80, 81, 82]. La lesión anóxica comienza con una disminución de la producción de energía mitocondrial y por lo tanto una caída de la energía celular (ATP). Debido a la deficiencia de energía, se producen desbalances de los iones celulares, la activación de hidrolasas y el aumento de la permeabilidad de las membranas celulares.

Estas alteraciones siguen solo en parte un orden secuencial y puede ocurrir la auto-amplificación de los procesos y la propagación a través de diversas vías. El pH citosólico disminuye debido a la degradación del ATP, al aumento de la tasa glucolítica con acumulación de lactato y a la liberación de H^+ de lisosomas dañados. En paralelo, se deteriora la homeostasis celular de iones, lo que implica un aumento de las concentraciones citosólicas de Na^+ y Ca^{++}. Ambos sucesos están relacionados debido a que fallan los mecanismos compensatorios que regulan el pH. Se produce una disminución de la actividad de la bomba de Na^+/K^+ ATPasa y se genera un mayor intercambio de Ca^{++} y Na^+ por el contra-transportador Na^+/Ca^{++} que en las etapas avanzadas de la isquemia comienza a funcionar en el modo inverso. El aumento mencionado de la concentración citosólica de Ca^{++} puede activar hidrolasas, tales como las fosfolipasa A2 y proteasas (calpaínas y otras)[79]. Las hidrolasas producen la proteólisis de proteínas del citoesqueleto lo que aumenta el proceso de lesión tisular. Al mismo tiempo, el aumento de Ca^{++} citosólico y la hipoxia generan un aumento en la permeabilidad de la membrana mitocondrial que produce un fracaso en la fosforilación oxidativa con un agotamiento progresivo del ATP. A su vez, la edematización de las mitocondrias y el aumento de la permeabilidad llevan a la liberación de citocromo c. El citocromo c activa una cascada de señalización que involucra a las caspasas 1 y 9 provocando la apoptosis celular. Por otra parte, el aumento de Na^+ celular puede causar edema celular, que contribuye al daño de la membrana plasmática resultando finalmente en la muerte celular por necrosis[83](Figura 3).

Por otro lado, el período de isquemia se asocia con una alteración importante en la expresión génica y la reprogramación de la transcripción. Por ejemplo, en condiciones de

normoxia las enzimas prolil hidroxilasas (PHD) reguladoras del factor inducible por hipoxia (HIF) modifican post-traduccionalmente la subunidad alfa de dicho factor, agregándole hidroxilos en residuos de prolina específicos. Dicha modificación permite su reconocimiento, lo que deriva en su ubiquitinación y proteólisis. A diferencia, en condiciones de hipoxia, la falta de oxígeno imposibilita la acción de estas enzimas, permitiendo la acumulación de la subunidad alfa, su translocación al núcleo y la formación del factor de transcripción activo junto con HIF-1β, permitiendo la transcripción de genes que promueven la adaptación y sobrevida tisular [84, 85].

4.2. Daño en la fase de reperfusión

El restablecimiento del flujo sanguíneo, paradójicamente, inicia una cascada de eventos que pueden conducir a daño celular adicional, más allá del provocado por la isquemia (Figura 3). La lesión por reperfusión se caracteriza por respuestas autoinmunes, incluyendo el reconocimiento de neoantígenos por anticuerpos naturales y la posterior activación del sistema de complemento[86]. Durante la reoxigenación se generan nuevas lesiones por el aumento en la producción de las especies reactivas del oxígeno (ERO) y el nitrógeno en las células parenquimatosas, endoteliales, plaquetas y leucocitos activados que infiltran la zona [87, 88]. Estos radicales libres; tales como el anión superóxido, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo; se pueden generar en los tejidos reperfundidos como consecuencia de lesiones mitocondriales, por una reducción incompleta del oxígeno o por la acción de las oxidasas. Durante la fase isquémica, las enzimas involucradas en la transferencia de electrones sufren proteólisis; tras la reperfusión, se produce una transferencia de electrones al oxígeno por las enzimas dañadas, lo que resulta en la formación de ERO. En condiciones normales, los efectos nocivos del superóxido son prevenidos por la superóxido dismutasa, que convierte al anión en peróxido de hidrógeno, la glutatión peroxidasa y la catalasa convierten al peróxido de hidrógeno en agua[89, 90]. Durante la reperfusión, esta defensa natural se ve superada y el peróxido de hidrógeno es convertido en radical hidroxilo, capaz de dañar una amplia variedad de moléculas, incluyendo aminoácidos, proteínas de transporte de membrana, lípidos, citocromos, y ácidos nucleicos lo que lleva a la disfunción o muerte celular[91, 92, 93, 94]. La muerte puede darse por necrosis o apoptosis, pudiéndose activar ambas vías tanto la intrínseca como la extrínseca. La apoptosis consiste en una cascada de señalización de caspasas que induce a un programa regulado de muerte celular. En

cambio, en la necrosis, las células son muy inmunoestimulantes, llevando a la infiltración de células inflamatorias y a la producción de citoquinas proinflamatorias. Esto hace que todo el daño celular que ocurre durante el período de reperfusión, además, induzca y perpetúe la respuesta inflamatoria.

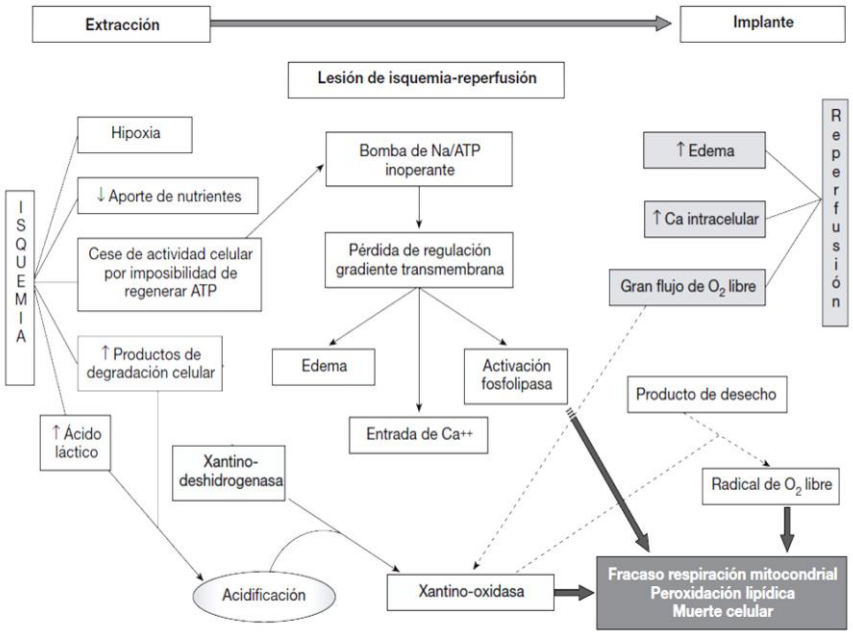


Figura 3: Fisiopatología de la lesión de isquemia-reperfusión. En la figura se describe la serie de procesos que se desencadenan por isquemia y por reperfusión y terminan resultando en muerte celular y el consecuente daño tisular. Fuente: Cobo JL, Medicina Intensiva, 2009.

4.3. Respuesta inmune en el daño por isquemia reperfusión

Las consecuencias de la isquemia-reperfusión son muy similares a la activación de una respuesta inflamatoria del huésped dirigida a microorganismos invasores[95]. Sin embargo, es una respuesta inflamatoria aséptica que puede ser iniciada por los restos de células dañadas. En este proceso se activan eventos de señalización a través de moléculas de reconocimiento de patrones, tales como receptores tipo Toll (TLR), reclutamiento y activación de las células del sistema inmune innato y adaptativo y la activación del sistema del complemento. Como la respuesta inmune desencadenada provoca un efecto adverso y genera un daño en el injerto, el tratamiento dirigido contra su activación es una alternativa terapéutica emergente en el tratamiento de la isquemia-reperfusión. Sin embargo, algunos aspectos de la respuesta inmune adaptativa, en particular en lo que se

refiere al reclutamiento y la expansión de células T reguladoras (Treg) puede ser beneficioso para el injerto [96].

4.3.1. Respuesta inmune innata

La respuesta inflamatoria desencadenada por muerte celular, como ya se mencionó tiene muchas similitudes con lo observado durante las infecciones microbianas. En particular, receptores que median la respuesta a los microorganismos como los receptores TLRs, pueden ser activados por moléculas endógenas en ausencia de compuestos microbianos en el contexto de daño o muerte celular; como ocurre durante la isquemia-reperfusión, participando en la activación de la inflamación aséptica[97]. La unión de los ligandos de TLRs conduce a la activación de vías de señalización, incluidas las de NF−κB y proteinquinasa activada por mitógenos (MAPK), lo que resulta en la inducción de citoquinas proinflamatorias y quimiocinas. Estos ligandos reciben el nombre de patrones moleculares asociados a daño (DAMPs). Muchos de estos ligandos como la proteína del grupo de alta movilidad Box1 (HMGB1) o la proteína de shock térmico 70 (HSP70) se encuentran normalmente secuestrados en el espacio intracelular, pero cuando hay daño tisular, se liberan al compartimiento extracelular donde pueden activar la respuesta inmune[98, 99]. De esta forma, la respuesta inflamatoria puede iniciarse a partir del reconocimiento de DAMPs a través de los receptores celulares o también a partir de la activación celular, especialmente la de macrófagos, células dendríticas y células endoteliales, que son activadas por la secuencia de anoxia y reoxigenación debido al aumento de Ca^{++} citosólico. Mediadores como las moléculas de adhesión, citoquinas y quimiocinas pueden ser expresados por estas células activadas provocando el reclutamiento de células del torrente sanguíneo. Las moléculas de adhesión celular en la superficie de los leucocitos interactúan con sus ligandos en las células endoteliales e inician una secuencia altamente coordinada que conduce, en última instancia, a la emigración de leucocitos desde el torrente sanguíneo[100]. El proceso de rodamiento, la adhesión estable al endotelio, y la emigración es un proceso bien ordenado y fue descripto como un suceso de tres pasos[101, 102, 103]. En primer lugar, plaquetas, células endoteliales, macrófagos y mastocitos, entre otros, reciben señales de daño tisular y responden produciendo citoquinas proinflamatorias tales como TNF−α[104], IL-1[105] y quimiocinas como el factor activador de plaquetas (PAF), leucotrieno B4 e IL-8[106, 107]. Inicialmente, los neutrófilos son atraídos al sitio de inflamación por medio de estas señales quimiotácticas. A su vez, el endotelio es activado por mediadores

proinflamatorios como la trombina, histamina o aniones superóxido, lo que resulta en la expresión en su superficie de la P-selectina, la interacción entre los ligandos de P-selectina de los neutrófilos (PSGL-1) y las P-selectinas de las células endoteliales da lugar a que los neutrófilos rueden con lentitud a lo largo del recubrimiento endotelial de los vasos[108, 109]. Las quimiocinas que fueron generadas en respuesta al daño se unen a glucosaminoglicanos en la cara luminar del endotelio vascular y cuando los neutrófilos ruedan sobre el endotelio, sus receptores para PAF e IL-8 se estimulan provocando una transducción de señales que lleva a la activación de las integrinas. Esto genera un cambio de estado de las integrinas (principalmente LFA-1 y Mac-1) de la membrana de los neutrófilos, que pasan de una conformación de baja afinidad a una conformación de alta afinidad. Por otro lado, la IL-1 y el TNF–α aumentan la expresión de moléculas de adhesión como ICAM-1 y VCAM-1 sobre las células endoteliales, favoreciendo la unión de estas moléculas a las integrinas presentes sobre la superficie de neutrófilos y monocitos, promoviendo la adhesión firme de los mismos al endotelio. Por último, las quimiocinas, actúan sobre los leucocitos adheridos al endotelio y estimulan su migración a través de los espacios interendoteliales hacia el sitio dañado. Después de atravesar el endotelio, los neutrófilos y monocitos rompen la lámina basal, probablemente segregando colagenasas, y entran en el tejido extravascular. Para ello, se adhieren a la matriz extracelular mediante la unión de sus integrinas y CD44, a las proteínas de la matriz.

La acumulación inicial de granulocitos debe ser muy controlada, ya que unos pocos granulocitos son capaces de impedir la adecuada reparación de los tejidos, mientras que un exceso de granulocitos puede promover la inflamación descontrolada y el daño tisular[110]. Existen varios mecanismos por los cuales los neutrófilos pueden tener efectos nocivos, que incluyen la secreción de enzimas proteolíticas como la elastasa de gránulos citoplasmáticos[111]; la producción de radicales libres a través del estallido respiratorio[112] y la obstrucción de la microcirculación a nivel capilar[113] provocando así la extensión del daño producido por la isquemia [114].

En el foco inflamatorio, además de granulocitos y monocitos, también se encuentran células dendríticas convencionales. Luego de la isquemia-reperfusión estas células experimentan un proceso de maduración independiente del antígeno inducido por DAMPs. Por ahora la importancia de estas células en el fenómeno de daño por isquemia reperfusión no es del todo claro. En un trabajo publicado, se observó que las células dendríticas podrían favorecer el daño a través de la producción de mediadores

proinflamatorios tales como TNF-α, IL-6, MCP-1 y RANTES; mientras que en otro, su depleción en este contexto llevó a un aumento de la inflamación y la lesión tisular [115].

4.3.2. Respuesta inmune adaptativa

Mientras que la activación del sistema inmune innato toma lugar en cuestión de minutos, la respuesta inmune adaptativa se evidencia días después del acontecimiento. Dicha respuesta involucra entre otros tipos celulares a los linfocitos T. Varios estudios han demostrado que las células T se acumulan durante la isquemia-reperfusión. Las células T se localizan en una zona que limita la zona isquémica, dentro de las 24 hs post-reperfusión, y se acumulan por un lapso de alrededor de 7 días, disminuyendo su número después del día 14[116]. Estudios en ratones deficientes en poblaciones específicas de linfocitos mostró que tanto los T $CD4^+$ y $CD8^+$ tienen un papel perjudicial en la isquemia-reperfusión del cerebro[117], corazón[118] y riñón[119]. Además, un estudio reciente sugiere un papel fundamental para la IL-17 producida por las células T$\gamma\delta$[120]. A su vez, niveles elevados de esta citoquina fueron encontrados en individuos que sufrieron un accidente cerebrovascular[121], así como en ratones expuestos a isquemia-reperfusión cerebral[120].

El mecanismo por el cual las células T antígeno específicas son activadas durante la inflamación aséptica, no se conoce bien todavía, pero evidencia emergente indica la contribución de ambos mecanismos de activación, antígeno dependiente e independiente[122, 123]. Por ejemplo, las células T se pueden activar a través de radicales libres de oxígeno, citoquinas o RANTES de una manera antígeno inespecífica, o mediante la activación por interacción con células presentadoras de antígenos. En este último caso, se observó que el bloqueo de la coestimulación disminuyó el daño en modelos animales de IRI [124, 125]. En contraste, las células Treg parecen tener un papel protector en IRI. Un estudio reciente utilizando un modelo de accidente cerebrovascular experimental mostró que la depleción de las células Treg aumentaba el daño cerebral y causaba un deterioro en el resultado funcional final [126].

4.4. Síndrome de post-reperfusión

El síndrome de post-reperfusión (SPR) es una consecuencia directa del daño por isquemia reperfusión que ocurre en el trasplante hepático. Como se describió previamente, el desequilibrio entre la oferta y la demanda de oxígeno trae como

consecuencia un déficit de energía que compromete la integridad estructural y funcional de las membranas, las cuales muestran una incapacidad para mantener las concentraciones fisiológicas de electrolitos, enzimas, y mediadores, en sus respectivos compartimientos. Una vez restituido el flujo sanguíneo, los componentes liberados al medio extracelular y la súbita carga de sangre fría, acidótica, con elevados niveles de enzimas y mediadores inflamatorios alcanzan la circulación periférica, llegando en segundos hasta el corazón del receptor, pudiendo generar un desacoplamiento ventrículo-arterial. A su vez, muchos mediadores inflamatorios tienen un efecto vasoconstrictor sobre las arteriolas pulmonares, y están implicados en el aumento repentino de la presión arterial pulmonar[127]. Al mismo tiempo, el efecto global sobre la circulación sistémica es una reducción de la resistencia vascular. De esta forma se pueden observar consecuencias clínicas inmediatas tales como colapso circulatorio, arritmias y muerte del paciente.

El SPR aparece típicamente en los minutos que siguen a la retirada de las pinzas quirúrgicas de los gruesos vasos venosos que ingresan y emergen del hígado trasplantado. Clínicamente se ha definido como una disminución de la presión sanguínea arterial sistémica mayor al 30%, durante al menos 1 minuto durante los primeros 5 minutos post-reperfusión[128]. Y es una de las causas de la disfunción primaria del injerto hepático (más del 10% de los casos), afectando los resultados globales del trasplante, se vincula con una mayor incidencia de rechazo tanto agudo como crónico y una elevada morbimortalidad en el post-operatorio[129]. Casos severos de SPR pueden provocar una falla multiorgánica y en este contexto uno de los principales órganos afectados es el riñón.

5. DISFUNCIÓN DEL ÓRGANO EN EL POST-TRASPLANTE

Una vez realizada la cirugía, se espera que el funcionamiento del órgano sea inmediato. Sin embargo, en la mayoría de los distintos tipos de trasplantes de órganos sólidos vascularizados está descripto la posible ocurrencia de un fenómeno en el cual el injerto no responde como lo esperado debido al daño al que se somete. Este fenómeno llamado disfunción del órgano es definido de forma diferente según el órgano trasplantado, e incluso, para un mismo tipo de trasplante, entre distintos centros y en la literatura[130, 131].

Sin embargo, esta descripto que uno de los mayores factores que influyen en un posterior desarrollo de disfunción es el tiempo prolongado de isquemia fría y caliente[132, 133, 134].
Independientemente del órgano trasplantado, el retraso en el funcionamiento de los órganos, se corresponde fuertemente con una mayor inmunogenicidad, menor sobrevida del injerto a largo plazo y con un mayor riesgo de rechazo agudo[135, 136]. Lo que condiciona un mayor riesgo de pérdida del injerto y una disminución de la sobrevida del paciente a largo plazo [137, 138, 139, 140, 141].

5.1. Disfunción Renal Post-trasplante

Para el trasplante renal, por ejemplo, la denominación es retraso de la función del injerto (DGF) y la definición más aceptada es la necesidad de diálisis dentro de la primer semana post-trasplante. El DGF es descripto como una discrepancia entre la capacidad funcional del injerto y de las necesidades fisiológicas del receptor, siendo una forma de insuficiencia renal aguda que resulta en oliguria post-trasplante. Alrededor del 30-50% de los trasplantados renales sufren DGF[142]. Sin embargo, en nuestro país la cifra de pacientes con DGF asciende al 60-70%[143]. Con respecto a la relación entre DGF y la sobrevida del injerto, se sabe que la vida media de un riñón con DGF es de 8,6 años en comparación con la vida media de 14,1 años de un riñón sin DGF.
Los términos, DGF y necrosis tubular aguda (NTA) se utilizan a menudo para definir el mismo trastorno, aunque el primero es un diagnóstico clínico y el segundo es una característica histopatológica. La degeneración de las células epiteliales tubulares, exfoliación de las células tubulares, edema intersticial e infiltración celular intersticial se observan generalmente en las biopsias de pacientes con DGF. Estos parámetros histológicos se asocian a una disminución de la filtración glomerular que genera una pérdida de la capacidad del injerto para excretar los desechos, concentrar la orina, conservar electrolitos y mantener el balance de líquidos.

5.2. Disfunción Hepática Post-trasplante

En el caso del trasplante hepático el SPR es una causa conocida de disfunción primaria del injerto. Aunque muchos de los órganos que sufren disfunción pueden recuperarse, aproximadamente el 5% no logran abastecer las necesidades del receptor y sólo el retrasplante urgente puede salvar al paciente.

La disfunción primaria del injerto (DPI), suele dividirse en dos manifestaciones; la disfunción temprana del injerto (DTI) y la no-función primaria (NFP). Ambas describen diferentes grados de impedimento funcional comenzando en el período intraoperatorio. Sin embargo, las definiciones no son claras en la literatura. La DTI se refiere a un mal funcionamiento del injerto dentro de la primer semana post-trasplante mediante el análisis de resultados alterados de laboratorio, entre ellos de alanino aminotransferasa, aspartato aminotransferasa, tiempo de protrombina, lactato y amonio sérico, entre otros[144, 145, 146, 147, 148, 149, 150]. Mientras que la NFP tiene una implicancia más severa que se asocia con un deterioro catastrófico clínico y de laboratorio. Se caracteriza por necrosis hepática, aumento de transaminasas séricas, coagulopatía, aumento de niveles de lactato, inestabilidad hemodinámica, hipoglucemia, falla respiratoria y renal[147, 148, 151]. A diferencia de DTI que es una condición con potencial recuperación, la NFP puede llevar a la falla del injerto, emergencia de retrasplante o muerte del receptor. En este tipo de trasplante es necesario destacar que la preservación hepática es más crítica que la renal ya que, al no disponerse de una máquina sustitutiva del órgano, es fundamental que las funciones del injerto retornen inmediatamente después del trasplante.

6. RECHAZO DEL ÓRGANO TRASPLANTADO

Una vez realizado el trasplante, el rechazo del órgano es una de las principales complicaciones, existiendo diferentes mecanismos de rechazo: el rechazo celular, humoral y mixto. Sin embargo, para que el rechazo tenga lugar, inicialmente debe haber un reconocimiento del órgano como extraño. Este aloreconocimiento puede ocurrir por vía directa, semidirecta o indirecta.

6.1. Mecanismos de activación de la respuesta alogénica

6.1.1. Vía directa

En esta vía, las células dendríticas (CDs) del donante, activadas por el entorno inflamatorio que conlleva el trasplante, migran al ganglio drenante y se encuentran con las células T del receptor. En los órganos linfáticos secundarios ocurre el aloreconocimiento entre el complejo proteína-CMH de las CDs del donante con los receptores T (TCR) de linfocitos T del receptor. Estos linfocitos T, se activan y migran al órgano trasplantado, el cual infiltran y desarrollan sus funciones efectoras. Los linfocitos T

CD4 contribuirán a generar una respuesta pro-inflamatoria que promueve el reclutamiento y activación de macrófagos, y los linfocitos T CD8 desarrollarán funciones citotóxicas contra células endoteliales y del parénquima del órgano trasplantado. Como el número de CDs en el órgano trasplantado es finito, esta vía es de mayor relevancia en el rechazo agudo (Figura 4A).

6.1.2. Vía indirecta

En la vía indirecta, las células T y las CDs, que interactúan son del receptor. Las CDs del receptor, procesan aloantígenos (alelos de HLA) y los fragmentos de péptidos procesados serán presentados en el contexto de las moléculas de histocompatibilidad del receptor. Esos péptidos serán reconocidos por el TCR de los linfocitos T del receptor, los cuales serán activados y ejercerán funciones efectoras. Este procesamiento antigénico no difiere del procesamiento de antígenos microbianos. La única diferencia es el antígeno, que en lugar de ser un antígeno microbiano, corresponde a un aloantígenos del donante del trasplante.

Este proceso puede ocurrir a lo largo de la vida del receptor, ya que el órgano se va a poblar de CDs propias, que, al encontrarse con fragmentos celulares y estímulos madurativos, podrán fagocitar, madurar y migrar al ganglio drenante donde serán capaces de presentarlos a linfocitos T, generándose clones T capaces de reconocer proteínas del donante (Figura 4B).

6.1.3. Vía semi-directa

Esta vía fue recientemente descripta y se refiere al proceso por el cual las células presentadoras de antígeno (CPA) del receptor adquieren moléculas de CMH clase I y/o de clase II, del donante. Como se indica en la Figura 3 el contacto célula a célula entre CPA del donante y el receptor puede permitir la transferencia de componentes de la membrana incluyendo CMH intactos (a). Por otro lado, las CPA del donante pueden liberar pequeñas vesículas llamadas exosomas, conteniendo CMH (b), las cuales pueden fusionarse con la membrana plasmática de CPA del receptor (c). La CPA del receptor, ahora quimérica, puede estimular células CD4 y CD8 tanto por vía directa como indirecta (Figura 4C).

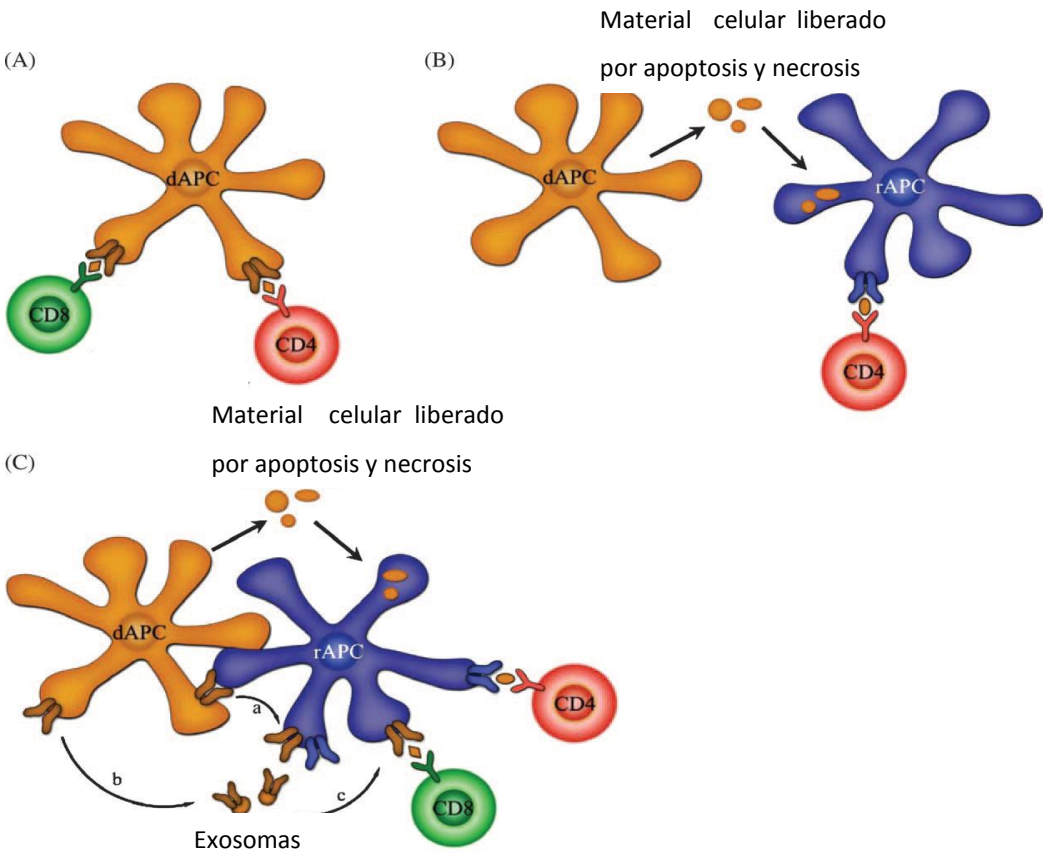


Figura 4: Mecanismos de activación de la respuesta alogénica. Vías de aloreconocimiento. A) Vía de activación directa. B) Vía de activación indirecta. C) Vía semi-directa. Edición basada en Afzali, Tissue Antigens, 2007.

6.2. Mecanismos efectores del rechazo al aloinjerto

Considerando el tiempo post-trasplante y las características histopatológicas, los rechazos se pueden clasificar en hiperagudo, agudo y crónico.

6.2.1. Rechazo hiperagudo

En este caso el tejido trasplantado es rechazado en cuestión de minutos a horas, debido a que la vascularización se destruye rápidamente. Este tipo de rechazo es mediado humoralmente y se produce porque el receptor tiene anticuerpos preexistentes contra el injerto, que pueden ser originados por transfusiones de sangre, embarazos múltiples o trasplante previo. Los complejos antígeno-anticuerpo activan el sistema del complemento, provocando trombosis masiva en los capilares, lo que impide la vascularización del

injerto. El riñón es más susceptible al rechazo hiperagudo mientras que el hígado es relativamente resistente. Sin embargo, este tipo de rechazo ha dejado de ser una causa importante de pérdida de injertos por la optimización en el pre-trasplante del análisis de compatibilidad entre donante y receptor respecto a los antígenos de grupo sanguíneo ABO y con la prueba cruzada para descartar la presencia de anticuerpos anti HLA del receptor dirigidos hacia los antígenos HLA del donante.

6.2.2. Rechazo agudo

El rechazo agudo se manifiesta comúnmente dentro del primer año post-trasplante. Este rechazo puede ser mediado por anticuerpos o células T. En el primer caso, la lesión del aloinjerto será mediada por aloanticuerpos, los cuales al formar el complejo inmune activarán al sistema de complemento. En el caso del rechazo celular agudo, será mediado por linfocitos T activados por alguna de las vías descriptas en la sección anterior.

La manera inequívoca de poner en evidencia el rechazo será con la realización de una biopsia confirmatoria. Las características histológicas de cada uno de estos rechazos en trasplante renal se indican en la Tabla 4.

Mediado por células T	**Mediado por anticuerpos**
• Inflamación túbulo-intersticial (células T, monocitos/macrófagos, eosinófilos).	• Inflamación microvascular (neutrófilos, macrófagos, etc.).
• Tubulitis.	• Glomerulitis.
• Edema intersticial (vacuolas claras en el intersticio).	• Capilaritis.
• Endarteritis o arteritis de la íntima.	• Trombosis capilar
	• Necrosis fibrinoide; • Necrosis arterial
	• Endarteritis.
	• C4d (en capilares peritubulares)

Tabla 4. Características de los rechazos agudos del injerto renal

También es posible detectar un rechazo mixto, con características histológicas de ambos tipos de rechazo, humoral y celular. Esto podrá observarse en pacientes que no adhieran

al tratamiento inmunosupresor o que hayan tenido que reducirlo, debido, por ejemplo, a una nefritis por infección con el virus BK.

6.2.3. Rechazo crónico

Este tipo de rechazo suele desarrollarse años post-trasplante. Los rechazos crónicos pueden también ser mediados tanto por anticuerpos como por células. Suele aparecer como fibrosis y cicatrización en todos los órganos trasplantados, pero el cuadro histopatológico específico depende del órgano trasplantado. En los trasplantes de hígado, a diferencia del rechazo agudo se caracteriza, por la tendencia a la desaparición de los ductos biliares interlobulillares y septales[152]. En los receptores de riñón, el rechazo crónico se manifiesta como fibrosis y glomerulopatía, y es una de las 4 causas más comunes de enfermedad renal en etapa terminal[153].

En la Tabla 5 se indican algunos de los criterios establecidos para la clasificación del rechazo crónico celular y humoral en trasplante renal.

Rechazo Celular	Rechazo Humoral
Inflamación intersticial y frecuentemente tubulitis	Duplicación de las membranas basales (glomerular y tubular)
Fibrosis intersticial y atrofia tubular	Capilaritis
Arteriopatía del trasplante (poco frecuente en la actualidad)	Depósitos de C4d

Tabla 5. Criterios de rechazos crónicos en trasplante renal.

7. ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS PARA FAVORECER LA SOBREVIDA DEL INJERTO.

Existen varias instancias en las que se puede intervenir para evitar la pérdida del injerto trasplantado y/o aumentar la sobrevida del aloinjerto, que serán desarrolladas en las siguientes secciones.

7.1. Técnicas de conservación y líquidos de preservación

Como se describió previamente el órgano trasplantado sufre una gran alteración de la homeostasis cuyo efecto se evidenciará en su funcionamiento post-trasplante. Con el fin de minimizar dichas alteraciones, se desarrollaron diferentes técnicas y líquidos de preservación. En Argentina el método de preservación utilizado para minimizar el daño al momento del traslado y conservación del órgano, es la preservación hipotérmica estática cuyo fundamento es la supresión del metabolismo celular mediante la hipotermia a 4°C. A esta temperatura ocurre un enlentecimiento de la actividad enzimática con disminución de los requerimientos de oxígeno. Sin embargo, la hipotermia por sí sola no es suficiente para una adecuada preservación, por lo que es necesario irrigar el órgano con soluciones especiales antes, durante y después del almacenamiento[154].

La preservación de órganos sólidos vascularizados comienza en muchos casos previo a la ablación. Una vez realizada, y con el fin de eliminar elementos formes para minimizar la posibilidad de coagulación, la sangre es reemplazada por una solución diseñada específicamente para optimizar la tolerancia del órgano a la hipotermia y a la falta de oxígeno. Dado al conocimiento adquirido sobre el IRI, cada componente de las soluciones de preservación fue elegido con una finalidad.

En primer lugar, es necesario evitar la edematización celular dada por la inactividad de la bomba de Na/K-ATPasa. Esto se logra utilizando líquidos de preservación que tengan una baja concentración de sodio y alta de potasio. También se utilizan soluciones iónicas con composición extracelular. Asimismo, los líquidos de preservación contienen sustancias impermeables para la célula a base de azúcares simples, lactobionato y trisacáridos para mantener una osmolalidad similar al plasma (310 mOsm/kg). Además, la isquemia genera acidosis tisular, por esta razón es necesario que las soluciones de preservación tengan sustancias tampón que mantengan el pH lo más próximo al pH fisiológico. También es preciso que contengan sustancias que aumenten la presión oncótica intravascular para evitar el edema intersticial y el colapso capilar, para lo que se utilizan derivados del almidón hidroxietílico. Los radicales libres liberados durante la isquemia fría y la reperfusión producen oxidación de las estructuras celulares y lesión celular. En esta situación, la defensa natural contra radicales libres se ve superada por lo que es necesario la adición de sustancias *scavenger* exógenas, como glutatión y manitol.

Existen diversas soluciones de preservación, por ejemplo la solución de la Universidad de Wisconsin (UW), EuroCollins (EC) y HTK (Histidina-Triptofano-Cetoglutarato) (Tabla 6)

[155]. La solución más aceptada es la UW a pesar de ser la más cara. Esta solución suele ser utilizada en trasplante renal, hepático y pancreático.

	HTK	EC	UW	
Sodio	15	10	30	Electrolito
Potasio	10	115	120	Electrolito
Magnesio	4	–	5	Electrolito
Cloro	50	15	–	Electrolito
Bicarbonato	–	10	–	Tampón
Fosfato	–	50	25	Tampón
Sulfato	–	–	5	Tampón
Histidina	100	–	–	Tampón, impermeante
Glucosa	–	195	–	Impermeante
Manitol	30	–	–	Impermeante
Rafinosa	–	–	30	Impermeante
Lactobionato	–	–	100	Impermeante
Adenosina	–	–	5	Precursor energético
Ketoglutarato	1	–	–	Precursor energético
Glutatión	–	–	3	Scavenger*
Alopurinol	–	–	1	Inhibidor, *scavenger**
HES	–	–	50 g/l	Sustancia coloidal
Triptófano	2	–	–	Fármaco**
Dexametasona	–	–	8	Fármaco**
Insulina	–	–	100 U/l	Fármaco**
Osmolalidad (mOsm/l)	310	355	320	

**Scavenger de radicales libres de oxígeno.*
***Fármaco: fármacos con otros mecanismos de acción.*
EC: EuroCollins; HTK: solución de Bretschneider o Custodiol; UW: solución de Belzer o de la Universidad de Wisconsin.

Tabla 6: Composición electrolítica (en mmol/l) de las principales soluciones de preservación.

La preocupación de los trasplantólogos por mejorar la calidad de los órganos donados ha impulsado en los últimos años el desarrollo de métodos de preservación mejores que el simple almacenamiento en frío[154, 156]. Actualmente, en algunos países, se utiliza un método de enfriamiento llamado máquina de perfusión hipotérmica (MPH). Esta permite una preservación en frío más prolongada y efectiva debido al aporte continuo de oxígeno, sustratos para la síntesis de ATP y otros metabolitos, y facilita el lavado de los desechos del metabolismo celular. Diversos estudios en trasplante renal, han demostrado que la MPH conlleva a una mejor función inicial y a largo plazo del injerto en comparación con la conservación estática en órganos de donantes con muerte encefálica[157]. Con esta máquina se ha observado que el DGF puede disminuir hasta llegar a afectar solo a un 10% de los pacientes trasplantados.

7.2. Tratamientos farmacológicos para la prevención del IRI

En relación con los tratamientos farmacológicos, hay numerosos estudios experimentales centrados tanto en inhibir los efectos nocivos de la isquemia como la respuesta inflamatoria asociada a la reperfusión. Con esta finalidad se han administrado fármacos como la cloroquina[158] o la clorpromazina[159], para prevenir las disfunciones mitocondriales y la degradación de fosfolípidos durante la isquemia. A su vez, se investigó bloquear la activación de neutrófilos y la infiltración con anticuerpos monoclonales específicos[160], así como también, se buscó disminuir la apoptosis bloqueando el calcio con un antagonista[161]. Pero sin lugar a dudas, y en base al conocimiento que se tiene sobre la fisiopatología del IRI, uno de los principales blancos de acción debería ser la producción de radicales oxidrilos. Al respecto, se describió el uso de tocoferol para minimizar los efectos de las ERO[162]. Sin embargo, el antioxidante más utilizado en experimentación y modelos clínicos es la N-acetilcisteína (NAC). El uso de NAC en modelos animales de IRI ha demostrado resultados alentadores[163, 164, 165]. En uno de los casos de IRI hepática se mostró una reducción significativa del daño oxidativo, aumento de glutatión, disminución de peroxidación lipídica, de alanina aminotransferasa y apoptosis celular[166]. Por otra parte, en un modelo de IRI renal, el pretratamiento con α–tocoferol y erdosteína redujo la peroxidación lipídica de membranas celulares renales[167]. A su vez se observó un aumento de la supervivencia de ratas isquémicas tratadas con α–tocoferol[168].

7.2.1. Ácido tióctico (ALA) como tratamiento para el IRI

Existen muchas drogas anti-oxidantes disponibles para ser probados en diferentes modelos de IRI. Uno de los anti-oxidantes más efectivos y que se usa en la clínica diaria, es el ácido lipoico (ALA). El ALA es un compuesto de origen natural creado en la mitocondria a partir del ácido octanoico como precursor[169]. Es un poderoso antioxidante natural que tiene actividad tanto en medio acuoso como lipídico. Actúa tanto a nivel intra como extracelular y tiene dos formas isoméricas. Debido a estas propiedades tiene un amplio potencial de acción farmacológica[170, 171]. Su papel biológico principal es como cofactor en las enzimas mitocondriales tales como α-cetoglutarato deshidrogenasa y piruvato deshidrogenasa[172]. ALA también parece estar involucrado en la producción de acetil-CoA, a través de la descarboxilación oxidativa de piruvato[173]. *In vivo*, ALA puede ser reducido en ácido dihidrolipoico (ADHL) el cual posee una mayor acción antioxidante. Ambos, ALA y ADHL, tienen capacidad quelante de metales (Fe^{2+}, Cu^{2+} y Cd^{2+}) y neutralizadora de ERO pero sólo el ADHL es capaz de regenerar antioxidantes

endógenos (glutatión y vitamina E, C) y reparar el daño tisular generado por ERO[174]. Sin embargo, no todos los efectos del ALA se deben a su actividad anti-oxidante. Por ejemplo, se pudo observar que varios de los efectos antiinflamatorios del ALA han sido mediados por su capacidad de inhibir NF-κB[175]. Es decir que ALA, no sólo es un anti-oxidante sino también una sustancia con actividad antiinflamatoria.

La utilización de ALA resultó ser protectiva en varios modelos experimentales, tales como IRI hepático[176], pancreatitis aguda[177] e IRI renal[178]. En este último estudio, la administración intraperitoneal de 100 mg/kg de ALA en animales que sufrieron 45 min de isquemia renal por la oclusión del pedículo renal fue capaz de revertir efectos deletéreos de la isquemia, tales como el aumento de la creatinina sérica, IL-1β, IL-6 y TNF-α, entre otros[179]. En ratas, también se determinó que la administración intraperitoneal de ALA previno la desregulación de aquaporinas y transportadores de sodio, que se observa en la reperfusión renal y atenuó el incremento de la expresión de endotelina-1, que conduce a la disfunción renal [178, 180]. En estos estudios, la administración de dosis alta de ALA (100 mg/kg) se realizó antes de la isquemia e inmediatamente antes del período de reperfusión.

También se han observado efectos beneficiosos en el uso de ALA en humanos. Varios estudios han documentado un efecto terapéutico positivo, en particular en enfermedades como diabetes, arteriosclerosis, enfermedades neurodegenerativas, y en SIDA, entre otras[174]. Los suplementos de ALA son relativamente seguros en las dosis consumidas en humanos. Las dosis de 600mg/día y 1800mg/día no tuvieron efectos secundarios durante un período de 1-6 meses. Luego de la ingesta oral, es excretado ampliamente por el riñón y se metaboliza en hígado con un elevado efecto de primer paso hepático[181]. En un ensayo clínico, se observó que el ALA disminuye el IRI hepático después de la oclusión y resección hepática[182]. Sin embargo, el efecto terapéutico más significativo de ALA en humanos es en las complicaciones inducidas por la diabetes, incluyendo la polineuropatía y la formación de cataratas[183]. De hecho, tanto la administración intravenosa de ALA como la oral están aprobadas para el tratamiento de polineuropatía diabética en varios países, incluso Argentina.

La gran cantidad de trabajos preclínicos ya mencionados junto con los efectos benéficos observados en humanos y la falta de efectos adversos severos justificarían el uso de ALA en trasplante, donde la producción y los efectos de EROs mostraron ser perjudiciales para la sobrevida del injerto.

Figura 5: Estructura química del ácido lipoico en su forma oxidada (A) y reducida (B). Fuente: Storm J Curr Pharm Des 2012.

7.3. Prevención del rechazo alogénico

Como se especificó previamente, antes de proceder a realizar un trasplante, debe valorarse la compatibilidad antigénica entre el receptor y el donante, con la finalidad de optimizar la sobrevida del injerto y minimizar posibles reacciones inmunológicas. Con este objetivo normalmente se realizan cuatro determinaciones. En primer lugar, es necesario establecer la compatibilidad del grupo sanguíneo ABO/Rh. Sin embargo, con la introducción de los métodos de eliminación de anticuerpos (plasmaféresis perioperatoria) y fármacos anti-linfocitos B como el rituximab, se logró disminuir el riesgo de estas complicaciones[184, 185]. Por esta razón, el trasplante ABO incompatible es una opción frente a situaciones desesperadas como una falla fulminante hepática y la falta de un órgano compatible[186, 187]. Con respecto al trasplante renal cada vez existe un mayor número de centros que realizan trasplantes satisfactorios con incompatibilidad ABO sin embargo no es la regla general[188, 189, 190].

A su vez, es necesario realizar la tipificación de los antígenos HLA clase I y II, buscando la máxima compatibilidad posible entre el donante y el receptor.

También es fundamental determinar la existencia de anticuerpos preformados contra antígenos HLA. Para lo cual se realizan pruebas específicas denominadas "*cross match* o prueba cruzada" cuya descripción detallada excede el objetivo de esta tesis. De manera resumida se puede mencionar que una vez que se escoge el donante, es una condición para la ejecución del trasplante, al menos renal, la realización de dicha prueba. Esta consiste en la incubación del suero del receptor con linfocitos del donante. En el caso de tener una reacción positiva, esta se interpreta como la existencia de anticuerpos específicos contra el donante, descartando la intervención. Por lo contrario, en trasplante hepático, no siempre suele realizarse la prueba cruzada. Esto es debido a que no está clara su relevancia en este tipo de trasplante, sumado a que el número de donantes

como el tiempo de isquemia que tolera este tipo de órganos es menor y usualmente suelen darse en situaciones de urgencia.

Una vez que se establece la compatibilidad, y se procede con el trasplante, es necesario comenzar con la inmunosupresión del receptor. Dicho tratamiento será necesario mientras el paciente posea el injerto ya que el objetivo es prevenir y controlar la respuesta inmune del receptor. El tratamiento debe ser individualizado existiendo múltiples combinaciones adaptables a las características clínicas y serológicas de cada paciente, al momento en curso del trasplante y a la experiencia de cada centro. El tratamiento inmunosupresor tiene dos etapas. En la etapa inicial, denominado tratamiento de inducción, se trata de lograr una inmunosupresión potente e intensa para prevenir el rechazo en la fase de máxima respuesta inmunológica que se produce en las primeras semanas post-trasplante. En la mayoría de los protocolos de inmunosupresión se utiliza una combinación de tres fármacos (*"triple terapia"*): 1- un inhibidor de la calcineurina, 2- un antiproliferativo y 3- esteroides. La inducción con un anticuerpo poli- o monoclonal (*"terapia cuádruple"*) está indicada para pacientes con elevado riesgo inmunológico o en aquellos pacientes en los que es conveniente evitar el uso de los anticalcineurínicos en la fase de inducción[191]. Posteriormente, sigue la terapia inmunosupresora de mantenimiento que tiene como objetivo conseguir a largo plazo una buena función del injerto con la máxima supervivencia y calidad de vida del receptor. Es necesario que el tratamiento sea lo menos agresivo posible y se encuentre correctamente regulado, ya que una sobre-inmunosupresión favorecerá la aparición de infecciones oportunistas y tumores, en tanto que una sub-inmunosupresión favorecerá el rechazo del injerto.

7.3.1. Drogas inmunosupresoras

Los diferentes fármacos inmunosupresores poseen diversos mecanismos de acción. Por ejemplo, los corticoesteroides actúan gracias a su potente acción antiinflamatoria. La unión a sus receptores citoplasmáticos determina la activación de la transcripción de determinados genes y la inhibición de otros. El complejo corticoide-receptor citoplasmático impide la activación de NF-κB mediante la inducción de la síntesis de su inhibidor IκB, siendo esta la explicación de algunos de los efectos antiinflamatorios e inmunosupresores que se les atribuyen[192]. Por ejemplo, sobre las células presentadoras de antígenos actúan inhibiendo la síntesis de IL-1 e IL-6, lo cual conduce al bloqueo de la diferenciación y la proliferación de los linfocitos T.

Otro tipo de fármacos utilizados son los inhibidores de calcineurina, como la ciclosporina y el tacrolimus (FK506). La calcineurina es una fosfatasa intracelular que se encuentra en las células T y que funciona defosforilando ciertas proteínas reguladoras de la transcripción de genes, permitiendo así, el pasaje al núcleo a través de la membrana nuclear. Estas proteínas reguladoras son capaces de activar la transcripción de ciertas citoquinas (IL-2, IL-4, TNF-α, IFN–α) que promueven la activación de las células T. La ciclosporina se une al receptor citoplasmático llamado ciclofilina, mientras que el tacrolimus se une al receptor citoplasmático conocido como proteína de unión al FK (FKBP: FK-binding protein). Tanto la ciclosporina-ciclofilina y el tacrolimus-FKBP se unen a la calcineurina, evitando su funcionamiento normal y de esta forma bloqueando la activación de las células T (Figura 6)[193]. Otra de las drogas inmunosupresoras que suelen recibir los pacientes trasplantados son los inhibidores de la síntesis de las purinas, como la azatioprina o el micofenolato mofetil. Estas drogas, suprimen el proceso de replicación génica y proliferación celular por la inhibición de la síntesis de ARN y ADN (Figura 6)[193]. La azatioprina es un análogo de las purinas, mientras que el micofenolato mofetil inhibe en forma reversible a la inosina monofosfato dehidrogenasa (IMPDH) que es crítica en la síntesis de dichas moléculas (Figura 6). Existen otras drogas inmunosupresoras que tiene otros blancos de acción. Por ejemplo, la rapamicina actúa sobre una quinasa denominada mTOR, que es importante en la regulación del ciclo celular. La inhibición de la quinasa por rapamicina, sirolimus (SRL) o everolimus bloquea la señal de proliferación en las células T, impidiendo su ingreso en la fase S del ciclo celular (Figura 6).

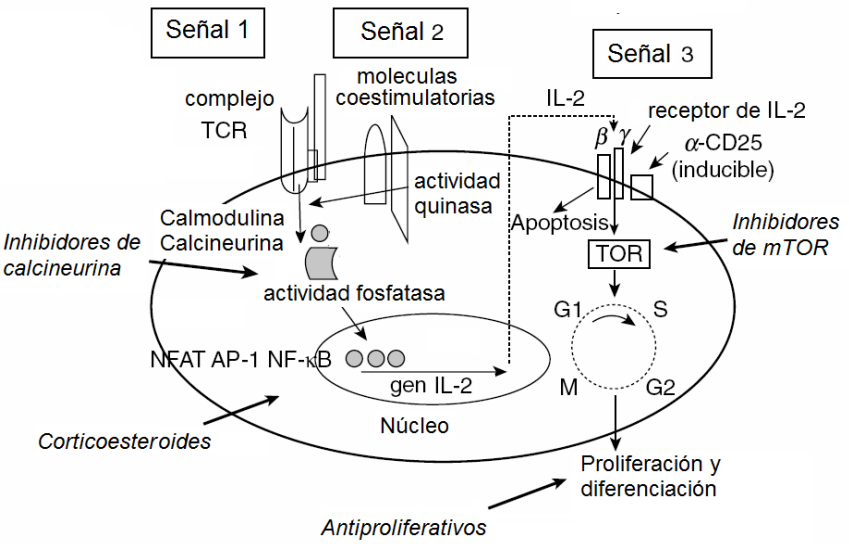


Figura 6: Representación esquemática de los eventos de señalización intracelular asociados a la activación de las células T. Señales: 1-Reconocimiento del antígeno, 2- Coestimulación, 3- Progresión del ciclo celular. AP: proteína activadora, IL: interleuquina, NFAT: Factor nuclear de células T activadas, TCR: receptor de células T, TOR: target de rapamicina.

Actualmente, se dispone de otro tipo de terapias inmunosupresoras, que consiste en la utilización de biológicos que tratan de evitar la activación T, al bloquear la coestimulación. Estos fármacos, denominados abatacept y belatacept, son proteínas de fusión constituidas por moléculas de CTLA-4 fusionados con fragmentos de Fc y tienen como objetivo unirse a las moléculas CD80 y CD86, para evitar que las mismas activen a la molécula CD28 presente en la membrana de los linfocitos T. Estos fármacos son potentes inmunosupresores. Los costos del mismo son elevados y aparentemente tendrían una mejor sobrevida del paciente al evitar los problemas de adherencia al tratamiento. Sin embargo, se ha informado de un número mayor de episodios de rechazos[194].

A pesar de los efectos benéficos que tienen las drogas inmunosupresoras para evitar el rechazo de los órganos trasplantados, también tienen múltiples efectos adversos. Uno de los efectos más importantes de los inhibidores de calcineurina es la nefrotoxicidad, que puede manifestarse en forma aguda o crónica. En la forma aguda muestra cambios hemodinámicos reversibles en la vasculatura glomerular y lesiones como la vacuolización isométrica de las células tubulares y la hialinosis arteriolar. En la forma crónica se ve fibrosis intersticial y atrofia tubular con la eventual pérdida del injerto[195, 196]. La principal

estrategia para hacer frente a dicha nefrotoxicidad incluye la minimización o eliminación de este tipo de fármacos, con o sin la conversión a rapamicina[197, 198].

Gracias a la optimización de las determinaciones de anticuerpos y a los estudios de compatibilidad, sumado a una nueva era en las terapias inmunosupresoras, las tasas de rechazo agudo han disminuido notablemente, mejorando de esta manera los resultados del trasplante a corto plazo. Sin embargo, por desgracia, a largo plazo las tasas de sobrevida del trasplante más allá de 5 años no han logrado una mejoría significativa[199, 200].

8. MANEJO DEL PACIENTE POST-TRASPLANTE

Los pacientes trasplantados una vez dados de alta, deben ser monitoreados periódicamente. Suelen ser evaluados para determinar los valores sanguíneos de marcadores de funcionalidad del órgano trasplantado. Este seguimiento es fundamental para mantener al paciente estable, dado que una alta inmunosupresión puede llevar a infecciones o desarrollo de cáncer y una baja inmunosupresión al rechazo del órgano. En el caso de presentar algún signo, por ejemplo, de infección, los médicos analizan el cuadro clínico y evalúan la realización de diferentes estudios para la confirmación del tratamiento. En el caso de sospechar un episodio de rechazo, el médico debe confirmarlo mediante una biopsia y el paciente recibe una mayor dosis de inmunosupresión, que se mantiene transitoriamente. Si éste evoluciona favorablemente con buen funcionamiento del órgano, sin manifestación de signos de rechazo, el médico irá disminuyendo gradualmente el nivel de inmunosupresión. Por esta razón, es de suma importancia para evitar la pérdida del injerto, tanto el control por parte del médico como la adherencia al tratamiento del paciente.

9. BIOMARCADORES DE DAÑO

Los avances en la problemática del trasplante como la optimización de la compatibilidad, y el uso de drogas inmunosupresoras, han permitido mejorar la sobrevida del injerto y el paciente. Sin embargo, la eficacia de estos tratamientos se ve soslayada por la difícil regulación entre la dosis y los resultados esperados, y por la aparición de efectos

secundarios, teniendo en cuenta que cada paciente tiene un repertorio inmunológico único y dinámico.

Por esta razón, sería de suma importancia el desarrollo de biomarcadores no invasivos, fiables y predictivos, que permitan predecir el rechazo, la sobrevida de un injerto y el estado inmunológico (o grado de inmunosupresión) del paciente para ajustar las dosis de acuerdo a las necesidades de los pacientes. Actualmente este punto se trata de manejar, haciendo determinaciones séricas de las drogas inmunosupresoras. Sin embargo, un nivel sérico de droga no necesariamente es un indicador válido del estado inmunológico del paciente. Por lo tanto, la búsqueda de biomarcadores que indiquen el estado de inmunosupresión, permitirá al médico un mejor manejo del paciente.

Al respecto, en los últimos años se han realizado varias investigaciones con este propósito. Por ejemplo Vasconcellos *et al* estudiaron los niveles de ARNm de granzima B, Fas Ligando y perforina 1 en leucocitos circulantes de pacientes y determinaron que los niveles de mensajero para estos mediadores eran significativamente mayores en pacientes que cursaban un rechazo agudo en comparación con pacientes sin rechazo[201]. Sin embargo, un estudio consecutivo mostró que los niveles de ARNm no diferían entre pacientes con rechazo e infección. Se ha evaluado también, la expresión de mensajeros (TIM-3 o INF-γ) en células en orina, observando un aumento de los niveles en pacientes con rechazo[202]. A su vez, se han postulado citoquinas en plasma y niveles de miRNAs en biopsias o linfocitos circulantes, como posibles biomarcadores[203]. Como se observa, la mayoría de estos estudios tienden a estudiar parámetros que permitan predecir el rechazo del órgano, pero ninguno de ellos busca determinar el grado de inmunosupresión. Lamentablemente, el último intento al respecto, que se basaba en la medición de la respuesta proliferativa de las células de sangre periférica al PHA, fracasó luego de realizar estudios multicéntrico[204].

Objetivos

El objetivo general de la presente tesis de doctorado es estudiar el rol de algunos mediadores en la fisiopatología y terapéutica en los trasplantes de órganos vascularizados.

Específicamente:

1. Determinar la expresión de marcadores inflamatorios en pacientes trasplantados con o sin DGF y su relación con factores inherentes al donante o receptor.

2. Examinar la posibilidad de usar al SLPI como biomarcador en trasplantes renales estudiando:

   i) Los niveles de SLPI en líquido de perfusión proveniente de órganos a trasplantar y su relación con el estado del paciente post-trasplante a corto y largo plazo;
   ii) Los niveles plasmáticos de SLPI en pacientes trasplantados y su relación con el estado del paciente post-trasplante.

3. Evaluar la utilidad del uso de un anti-oxidante en los trasplantes renopancreáticos, hepáticos y renales, y su impacto sobre la expresión de SLPI.

4. Estudiar el efecto de la administración del SLPI en modelos animales de daño renal.

5. Determinar el efecto del SLPI sobre células renales e inmunes, *in vitro*.

Materiales y Métodos

1. COMITÉ DE ÉTICA

Todos los estudios que involucran pacientes o material proveniente de pacientes fueron aprobados por el Comité de Ética de la Fundación Favaloro y por el Comité de Ética del Hospital Italiano. Por otro lado, los estudios con animales tienen la aprobación del CICUAL de la Facultad de Medicina, UBA.

2. PROTOCOLO DE LOS ESTUDIOS RELACIONADOS A LA FUNCION RETRASADA DEL INJETO

2.1. Pacientes

Para este protocolo, se reclutaron 34 pacientes trasplantados renales con criterio expandido, pertenecientes al Instituto de Nefrología, Nephrology. Los pacientes reclutados firmaron un consentimiento informado acorde con la declaración de Helsinki. Las actividades clínicas y de investigación reportadas en esta tesis son consistentes con los principios de la Declaración de Estambul, como se indica en la “Declaración de Estambul sobre el tráfico y el turismo de trasplantes de órganos”.

De estos pacientes, se obtuvieron biopsias al séptimo día post-trasplante. El procedimiento se realizó bajo guía ecográfica utilizando agujas de resorte. Los pacientes fueron agrupados según la presencia de DGF, la cual fue definida como la necesidad de hemodiálisis en la primera semana post-trasplante. En la Tabla 7 se muestran los criterios de inclusión y exclusión para los pacientes y en la Tabla 8 se muestra un resumen de las características clínicas de los pacientes enrolados en el estudio.

Todos los pacientes fueron tratados con:

- Terapia de inducción de timoglobulina (7 a 14 días) y metilprednisolona (500 mg i.v.)
- Terapia mantenimiento de inmunosupresión con sirolimus (8-12 ng/ml), micofenolato sódico (1440 mg) y prednisona (4 mg/día)
- Tratamiento profiláctico con Ganciclovir IV 5mg/kg/día o Valganciclovir 900mg/día y trimetoprim sulfametoxazol (TMP-SMX).

Criterios de inclusión	**Criterios de exclusión**
Donantes	**Donantes**
• 60 años o entre 50 y 59 años que cumplan al menos 2 de los siguientes criterios: • Antecedentes de hipertensión • Accidente cerebrovascular como causa de muerte • Creatinina sérica pre-ablación > 1,5 mg / dl	• Abuso de drogas intravenosas • VIH positivo • Riñones de donantes estándar
Receptores	**Receptores**
• Primer trasplante de riñón • Mayores de 18 años • Consentimiento informado firmado • Anticuerpo reactivo en el panel <20%	• Diabetes mellitus. • Uso crónico de esteroides. • Mujeres embarazadas / período de lactancia. • Antecedentes de cáncer o trastorno linfoproliferativo.

Tabla 7: Criterios de inclusión y exclusión para los pacientes enrolados en el protocolo de estudio del DGF.

	Grupo 1 (DGF, n=23)	***Grupo 2 (No DGF, n=11)***	***Valor P***
Edad del Receptor (años)	54,7 ± 8,2	50,1 ± 16,1	0,27
IMC del Receptor	25,7 ± 4,3	23,5 ± 1,3	0,10
Tiempo de diálisis (años)	4,8 ± 3,9	5,67 ± 2,7	0,51
HLA MM (A, B, DR)	3 ± 1,7	3,4 ± 1,1	0,48
TIF (Horas)	25,2 ± 3	23,9 ± 5,5	0,37
Edad del Donante (años)	56,4 ± 4,8	56,8 ± 4,6	0,81
IMC de los donantes	26,9 ± 4,2	27,9 ± 5,3	0,55
Creatinina pre-ablación(mg / dl)	1,8 ± 0,7	1,3 ± 0,3	0,03
Día 1 Diuresis (L)	0,37 ± 0,5	2,7 ± 2,5	0,0001
Día 1 Eco Doppler	0,81 ± 0,6	0,73 ± 0,09	0,66
Día 1 Uremia (mg / dl)	126,5 ± 27,4	119,1 ± 26,9	0,46
Día 1 Creatininemia (mg / dl)	7,62 ± 2	9,08 ± 1,5	0,039
Día 1 Na^+ sérico (mEq / L)	136,4 ± 3	135,2 ± 2,8	0,27
Día 2 Diuresis (L)	0,45 ±0,56	3,2 ± 2,3	0,0001
Día 2 Uremia (mg / dl)	142,9 ± 28	137,9 ± 31,2	0,64
Día 2 Creatininemia (mg / dl)	8,05 ± 2,2	8,52 ± 1,1	0,52
Día 2 Na^+ sérico (mEq / L)	135,7 ± 2,7	136,2 ± 2,4	0,60

IMC=índice de masa corporal; HLA MM= Antígeno Leucocitario Humano Incongruente

Tabla 8: Características de los pacientes trasplantados renales enrolados en el protocolo de estudio del DGF.

2.2. Microarreglo de biopsias de pacientes

El ARN fue aislado por el método basado en fenol a partir de biopsias renales por homogeneización en 5 ml de TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se purificó con el kit de aislamiento de ARN SABiosciences RT^2-qPCR-Grade, según las condiciones sugeridas por el fabricante. La concentración y pureza del ARN se determinó midiendo la absorbancia en un espectrofotómetro. Diluciones de la muestra se midieron en Tris 10 mM a pH 8. La relación de las absorbancias A230/A260 fue mayor que 1,7 y A260/A280 fue mayor que 2,0 en todas las muestras analizadas.

Alícuotas de cada muestra de ARN fueron corridas en un gel de agarosa desnaturalizante detectándose bandas para el ARN ribosomal 18S y 28S. Las muestras con señales de degradación del ARN en el gel de agarosa fueron descartadas. Se realizó la retrotranscripción de 1μg de ARN a ADNc utilizando el kit de "RT2 *First Strand*" (SABioscience). A continuación, se llevó a cabo un microarreglo "*Human Innate & Adaptive Immune Responses RT² Profiler™ PCR Array*" (PAHS-052Z, Frederick, MD) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Este microarreglo o matriz permite la determinación de un total de 84 genes relacionados con la inflamación (Tabla 9). En estas matrices se analizaron inicialmente 16 ADNc obtenidos a partir de muestras de biopsias renales. Para esto se realizó qPCR en tiempo real utilizando un formato de 96 pocillos y como equipo de qPCR se utilizó el modelo 7500 de Applied Biosystems.

APCS	C3	CASP1	CCL2	CCL5	CCR4	CCR5	CCR6	CCR8	CD14	CD4 A11	CD40 A12
CD40LG	CD80	CD86	CD8A	CRP	CSF2	CXCL10	CXCR3	DDX58	FASLG	FOXP3	GATA3
HLA-A	HLA-E	ICAM1	IFNA1	IFNAR1	IFNB1	IFNG	IFNGR1	IL10	IL13	IL17A	IL18
IL1A	IL1B	IL1R1	IL2	IL23A	IL4	IL5	IL6	CXCL8	IRAK1	IRF3	IRF7
ITGAM	JAK2	LY96	LYZ	MAPK1	MAPK8	MBL2	MPO	MX1	MYD88	NFKB1	NFKBIA
NLRP3	NOD1	NOD2	RAG1	RORC	SLC11A1	STAT1	STAT3	STAT4	STAT6	TBX21	TICAM1
TLR1	TLR2	TLR3	TLR4	TLR5	TLR6	TLR7	TLR8	TLR9	TNF	TRAF6	TYK2
ACTB	B2M	GAPDH	HPRT1	RPLP0	HGDC	RTC	RTC	RTC	PPC	PPC	PPC

Tabla 9: Lista de genes analizados en las biopsias de pacientes trasplantados renales enrolados en el protocolo de estudio del DGF.

Los cebadores utilizados en la matriz fueron probados y confirmados por el fabricante. El ensayo incluyó controles positivos y negativos como también tres genes control para la normalización de la expresión. El análisis de los resultados se basó en el método ΔCt donde se normalizan los niveles de mensajeros de genes inflamatorios con los del gen control. La información fue analizada utilizando el software sugerido por el fabricante: "*PCR array data analysis software*" (SABiosciences). Se utilizó un umbral de corte del doble de veces de expresión para definir el aumento o disminución de la expresión de los genes analizados.

Para el análisis de la información obtenida de la matriz de qPCR se utilizó el software "*SABiosciences RT2 Profiler Data Analysis*" para determinar los perfiles de expresión génica (http://www.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php), el cual determinó los índices de cambio para cada gen utilizando el método de cuantificación relativa 2ˆ(-ΔΔCt). Los valores de ΔCt fueron normalizados utilizando los valores de Ct promedio de tres

genes control: β-Actina, β-2-microglobulina y GAPDH. Todos los pocillos con valores de Ct mayores a 35 fueron excluidos del análisis.

2.3. RT- qPCR

Los resultados de la matriz fueron analizados para su confirmación mediante RT- qPCR. Muestras de RNA provenientes de 11 pacientes sin DGF y 23 pacientes con DGF fueron testeadas para la expresión de IL-1R1, IL-10, IL-1F7, IFNA1, HMOX-1 and TGF-β utilizando *qPCR SuperMix Universal* (Invitrogen, Ca). Los cebadores fueron diseñados por nuestro grupo, las secuencias de los mismos se muestran en la Tabla 10. La solución para la amplificación fue preparada utilizando los reactivos del kit "*one-step SYBR Green Quantitative RT-PCR*" (Invitrogen, Ca) a la que se le agregó 0.25 μM de cada primer y ADNc. Las condiciones de ciclado para la amplificación fueron: 30 min a 42°C, 2 min a 94°C, y 40 ciclos de 15 s a 95°C, por último 1 min a 60°C. La especificidad de los cebadores se chequeó con gel de agarosa post-amplificación y por curva de fusión. Los niveles de transcripto de β-actina humana fueron analizados para cada muestra para su posterior utilización como gen normalizador. Los resultados fueron expresados como 2^(-ΔCt), siendo ΔCt, la resta entre el valor de Ct del gen target y el gen control.

GEN	SECUENCIA
IL-1R1	CCTCTGAAGATGGTGACTCC GTAATGTCCTGAATCCTCCA
IL-10	TGCAAAACCAAACCACAAGA GGCAGGTTGCCTGGGAAGTG
IFNA1	GAGTCACCCATCTCAGCAAG TCAGACAGGAGGAAGGAGAG
TGF-β	TCCGCGGAGCAGCCAGACAGC GCAGGGGGTGCGCCCGAGGT
HMOX-1	GTCAACGCCTGCCTCCTCTC TCAGGGCCTCTGACAAATCC
IL-1F7	CATTCCATTTTCTGTTGAGT GACCCCCAGGAGAATCGGACT
β-ACTIN	CGCCCCGCGAGCACAGAGCC TCTCCATGTCGTCCCAGTTG

Tabla 10. Secuencia de cebadores utilizados para RT- qPCR de biopsias de pacientes trasplantados renales en el estudio del retraso en la función del injerto.

3. PROTOCOLO DE USO DEL LÍQUIDO DE PERFUSIÓN

3.1. Pacientes

Este protocolo se llevó a cabo en el Instituto de Nefrología, Nephrology de Buenos Aires. El líquido de perfusión colectado para estos estudios, es el que habitualmente se utiliza para lavar al órgano, inmediatamente previo al trasplante, y es comúnmente descartado. Al no existir intervención ni manipulación adicional, más allá del procedimiento habitual del trasplante, para esta parte del estudio no fue necesaria la firma de un consentimiento informado. La obtención de datos clínicos fue de manera retrospectiva, descriptiva, anónima y forman parte del uso habitual de información del Instituto para la redacción de trabajos científicos o la recopilación de datos de seguimiento de los pacientes.

Se recuperó el líquido de perfusión de riñones que fueron utilizados para trasplantar a 34 pacientes. Los órganos fueron provenientes de 17 hombres y 17 mujeres. Con respecto a los receptores del trasplante, fueron 13 mujeres y 21 hombres. En la Tabla 11 se muestran las características de los donantes y de los receptores.

Receptor	Edad del Receptor (años)	57,1 ± 14,9
	Tiempo de diálisis (años)	6,1 ± 3,4
	TIF (horas)	20,1 ± 5,2
Donante	Edad del Donante (años)	49,6±18,1
	IMC de los donantes	28,2±6,8
	Creatinina pre-ablación(mg/dl)	1,05±0,06

Tabla 11: Características de los donantes y receptores de los injertos reclutados para el estudio en líquido de perfusión.

3.2. Obtención de líquido de perfusión de órganos a trasplantar.

Los órganos fueron perfundidos con 500ml de solución de Wisconsin previo a su implante en el receptor. Para estos estudios, se conservaron los primeros 50 ml de líquido de perfusión y los 50 ml finales, los cuales se preservaron a -20 ºC para la posterior medición de mediadores inflamatorios.

4. PROTOCOLOS CLÍNICOS PARA LA PREVENCIÓN DEL DAÑO POR IRI

4.1. PROTOCOLO ÁCIDO α-LIPOICO EN PACIENTES TRASPLANTADOS RENOPANCREATICOS

4.1.1. Pacientes

El estudio incluyó 26 pacientes con trasplante simultáneo de riñón-páncreas (SRP). Los pacientes reclutados en dicho estudio fueron 11 varones y 15 mujeres, en un rango de edad 21-57 años. Los trasplantes se realizaron entre 28/04/2011 y 17/01/2013 en el Instituto de Nefrología, Nephrology de Buenos Aires. Dado que ambas formas de ALA, intravenosa y oral son aprobadas para mitigar la polineuropatía sensitivomotora diabética en Argentina, todos los pacientes reclutados para el estudio presentaban dicha afección. Todos los pacientes recibieron como terapia de inducción Timoglobulina (1,5 mg / kg durante cinco días) y Solumedrol; y como terapia de mantenimiento una triple inmunosupresión (tacrolimus con niveles de 10-12 ng/ml, prednisona 4 mg/día y micofenolato sódico 1,440 mg/día).

Los pacientes fueron aleatoriamente divididos en tres grupos: 1) Control: pacientes que no recibieron tratamiento con ALA; 2) R-ALA: pacientes a los que se les administró una dosis de ALA (600 mg) inmediatamente antes del procedimiento quirúrgico; y 3) DR- ALA: pacientes que además de recibir una dosis de ALA (600 mg) inmediatamente antes del procedimiento quirúrgico, tal como el grupo anterior, también recibieron órganos provenientes de donantes cadavéricos a los que se les administró ALA (600 mg) en el momento de la procuración. El objetivo de la administración de ALA fue reducir el efecto desfavorable de las EROs que se producen en todo el proceso conocido como IRI, que comienza en el donante y continúa en el receptor. Este diseño experimental de comparar el grupo DR-ALA con el grupo R-ALA tuvo como objeto desentrañar el impacto de EROs que se producen durante las diferentes etapas del proceso de IRI.

El tratamiento del donante cadavérico, llamado precondicionamiento, se realizó justo antes del procedimiento de procuración, por goteo intravenoso (20 min) de 600 mg de ALA diluidos en 250 ml de solución salina al comienzo del proceso de ablación, que tiene una duración total de aproximadamente 90-120 minutos. La elección de la dosis

administrada a los donantes se basó en los trabajos de Dunschede *et al* y Muller *et al*, con humanos y roedores, respectivamente[182, 205]. Además, esta dosis es la dosis aprobada por nuestras autoridades de regulación locales para tratar la neuropatía diabética. La administración de dicho antioxidante se considera parte del proceso normal de extracción de órganos, y por lo tanto, no fue necesario un consentimiento informado más allá del asociado con la donación de órganos. Los órganos fueron almacenados en frío hasta el trasplante.

Las muestras de sangre para la obtención de plasma y la medición de los mediadores se adquieren al principio de la cirugía, luego del desbloqueo sanguíneo, 12 h después de la cirugía y cada uno o dos días después del trasplante durante al menos 14 días o hasta el alta del paciente. Estas muestras sirvieron, no sólo para la medición de los mediadores inflamatorios, sino también como parte de la determinación rutinaria de analitos para evaluar la función renal y pancreática. Además, biopsias de riñón y páncreas fueron tomadas al final de la cirugía para realizar un estudio de RT- qPCR. La cantidad de tejido de biopsia no fue suficiente para realizar de manera simultánea estudios de inmunohistoquímica.

4.1.2. Citoquinas inflamatorias séricas

Los niveles plasmáticos de IL-8, IL-1β, IL-6, IL-10, TNF-α e IL-12p70 se midieron en la muestra previa a la cirugía y a las 12 h después del trasplante usando el kit "*BD™ Cytometric Bead Array*" (BD Biosciences, San Jose, CA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Tanto las muestras como la curva estándar fueron incubadas con estos reactivos y luego se pasaron por un citómetro de flujo FACSCalibur para su detección. El análisis de datos se llevó a cabo utilizando el software FCAP Array.

4.1.3. Determinación de los niveles de SLPI plasmáticos

Los niveles de SLPI plasmáticos se determinaron utilizando un ELISA sándwich. Para esto se adhirió un anticuerpo monoclonal de ratón anti-SLPI humano (1μg/ml, R&D) a la superficie de placas de 96 pocillos (de alta unión a péptidos) por 18h a 4°C. Luego se bloqueó la placa durante 1h a 37°C con 0,5% seroalbumina bovina (Sigma) y 1% leche baja en grasa en PBS 1X (solución de bloqueo). Posteriormente los pocillos se lavaron con PBS/Tween 20 0,1% y se incorporaron las muestras de plasma y el estándar; estas

se conservaron por 1h a 37°C. Una vez cumplido el tiempo de incubación se agregó el segundo anticuerpo policlonal de conejo anti-SLPI humano en solución de bloqueo (1/1000), dejándose 1,5 h a 37°C. Luego, los pocillos se lavaron con PBS/Tween 20 0,1%. Por último, se incubó durante 1 h con el anticuerpo policlonal de cabra anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa (1/1500, Chemicon) en solución de bloqueo. Se reveló con 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (Invitrogen), la reacción fue detenida con ácido sulfúrico 1N y la absorbancia leída a 450nm con resta de 630 nm en lector de placas de ELISA (Rayto, China).

4.1.4. Determinación de los niveles de PAP (Reg3a)

Reg3/PAP se determinó por ELISA sándwich siguiendo las instrucciones del fabricante (Páncreas PAP, Dynabio, Francia). El kit consta de una placa de 96 pocillos con el anticuerpo de detección anti-Reg3a ya adherido. Sembradas las muestras y la curva estándar, se dejó incubar durante 3 h a temperatura ambiente. Luego se realizaron lavados con PBS/Tween 20 0,1%. Una vez finalizada la incubación, se agregó el anticuerpo anti-Reg3a biotinilado por 30 min a temperatura ambiente. Luego se procedió a lavar y se agregó la avidina-peroxidasa, incubándose 15 min a temperatura ambiente. Finalmente, se lavó y se agregó la solución de sustrato (TMB), la cual se dejó 10 min, deteniendo la reacción con ácido sulfúrico. La absorbancia se leyó en un lector de placas (Rayto, China) a 450 nm con resta de 630 nm. La concentración Reg3a / PAP se midió antes y a las 12 h post-trasplante y se expresó como nanogramos por mililitro (ng / ml).

4.1.5. RT- qPCR

La determinación de transcriptos de moléculas en biopsias de pacientes se realizó a través de ensayos de RT- qPCR. Las biopsias fueros mantenidas a -80°C en solución RNA *later* (Ambrion, US) hasta su procesamiento. Fueron procesadas 19 biopsias (11 controles y 8 del grupo DR). Inicialmente se llevó a cabo la purificación de ARNm utilizando el *Mini kit RNeasy* (QUIAGEN). Con las biopsias se realizó un homogenato en seco utilizando nitrógeno líquido. Este se resuspendió en buffer de lisis *RLT Plus* mediante la utilización de agujas de distinto calibre para su mejor degradación. Se realizó una centrifugación de 3 min a 10.000 rpm. Al sobrenadante se lo pasó por una columna *gDNA eliminator* (30 seg a 10.000 rpm). Al eluído se le agregó etanol 70% y se

transfirieron 0,7 ml a la columna *RNeasy*. Luego de la centrifugación (15 seg a 10.000 rpm), se descartó el eluído y se lavó la columna con buffer *RW1*. A la columna se le agregó buffer *RPE,* y se lavó dos veces (15 seg y 2 min a 10000 rpm). Se realizó una centrifugación en seco para eliminar todo el buffer posible. Por último, a la columna se le agregó 50 μl de agua libre de ARNasa, se centrifugó 1 min a 10.000 rpm y se recuperó el eluído. Se realizó una cuantificación utilizando un equipo Nanodrop, determinándose la pureza analizando la relación entre las absorbancias a 260 y 280 nm. Luego se obtuvo ADNc, mediante la utilización de un kit "RT2 *First Strand*" (QIAGEN). Para esto se centrifugó 15 seg los 50 μl obtenidos de ARN. Se preparó la mezcla de *gDNA elimination* para cada muestra a la que se le agregó 700ng de ARN llegando a un volumen final de 10 μl. Se centrifugó e incubó a 42ºC por 5 min, inmediatamente se pasó a hielo y se dejó 1 min. Se preparó el *RT Cocktail* (según protocolo). A la mezcla de *gDNA elimination* se le agregó 10 μl del *RT Cocktail*, se incubó durante 15 min a 42ºC, y se detuvo la reacción calentando a 95ºC por 5 min. Por último, se agregaron 91 μl de agua destilada.

Para la cuantificación de los niveles de transcriptos, el kit utilizado fue el de *SYBR GreenER qPCR SuperMix Universal* (Invitrogen). Se preparó una Master mix para cada gen, con SYBR Green, ROX *reference*, cebador 5', cebador 3' y agua ultra pura. A 22,5 μl de cada master mix se le agregó 2,5 μl de cada muestra. El instrumento utilizado para qPCR fue un *Corbett Research Rotor-Gene 6000* (QIAGEN, Valencia, CA). El programa de ciclado utilizado fue: 5min a 50°C; 45 ciclos de 10 segundos a 95°C, 15 segundos a 60°C y 20 segundos a 72°C. La especificidad de los cebadores se chequeó con gel de agarosa post-amplificación y por curva de fusión.

El análisis de datos se basó en el método 2^(-ΔΔCt) con la normalización de los datos en bruto en relación a los niveles de expresión del gen control, en este caso GAPDH. Los cebadores de cada gen (Tabla 12) fueron diseñados y evaluados por nuestro grupo de investigación.

GEN	SECUENCIA
HMOX-15´	GTCAACGCCTGCCTCCTCTC
HMOX-13`	TCAGGGCCTCTGACAAATCC
TNF-a 5´	GCAAGGACAGCAGAGGACCA
TNF-a 3´	AGTGCTCATGGTGTCCTTTC
C3 5´	CCTGCTGCTCCTGCTACTAA
C3 3´	TCCAGCACCATGGTCTCCTC
TGF BETA 1 5´	TCCGCGGAGCAGCCAGACAGC
TGF BETA 1 3´	GCAGGGGGTGCGCCCGAGGT
GAPDH 5´	GCCTCCCGCTTCGCTCTCTG
GAPDH 3´	GCCAGCATCGCCCCACTTGA

Tabla 12: Secuencia de genes analizados en biopsias renales y pancreáticas en el protocolo "Uso de ácido lipoico en trasplante renopancreáticos".

4.1.6. Evaluación Clínica

Los pacientes trasplantados fueron evaluados para determinar la función renal y pancreática, definiéndose a la disfunción renal como una disminución de la creatinina menor al 70% de la creatinina basal al séptimo día post-trasplante o la necesidad de hemodiálisis durante la primera semana. La pancreatitis clínica se definió como un estado clínico de distensión abdominal, dolor abdominal, hinchazón del injerto y la necesidad de descanso del páncreas con nutrición parenteral total. Este diagnóstico fue realizado de forma independiente de este estudio por los médicos que estaban a cargo del paciente y se registró en la base de datos del paciente. También se evaluó la supervivencia tanto del injerto como del paciente a los 3 meses post-trasplante para determinar el impacto de estos primeros eventos en la evolución del trasplante.

4.2. PROTOCOLO ÁCIDO α-LIPOICO EN PACIENTES TRASPLANTADOS HEPÁTICOS

4.2.1. Pacientes

Este estudio clínico fue realizado en el Hospital Italiano de Buenos Aires y se trata de un ensayo clínico aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo para evaluar el uso del

ácido α-lipoico en el daño por isquemia-reperfusión en trasplante hepático. Se reclutaron 23 pacientes. Los criterios de inclusión fueron, que los pacientes sean mayores de 18 años y que reciban un trasplante hepático independientemente de su etiología; en tanto que los criterios de exclusión, fueron pacientes menores de 18 años o con hígados reducidos (Donante vivo relacionado, Split). De los 23 pacientes enrolados doce eran del sexo masculino y once femenino. La edad media de los pacientes fue de 60,9 ± 6,8 años. La etiología de la cirrosis fue infección por hepatitis C asociado a hepatocarcinoma en 10 (44%) pacientes, alcohol en 5 (20%) y otras causas en 7 (30%) pacientes.

Con respecto a las características de los donantes: 11 de los 23 (48%) no eran donantes óptimos y presentaban criterios de "donantes con criterio expandido" [donante corazón parado, pacientes > 65 años, sodio sérico >155 mEq/L, macroesteatosis > 30%, prolongado período de isquemia fría (>16 horas), prolongada isquemia caliente (>90 minutos)].

La mediana del valor de MELD (que es un índice pronóstico utilizado para valorar la gravedad de la insuficiencia hepática) de la población fue de 24 puntos y no hubo diferencias entre los dos grupos

Los pacientes se dividieron en dos grupos: Control y Tratado. Del total de pacientes incluidos, 13 pertenecieron al grupo tratado (tratados con α–lipoico) y 10 al grupo control. La administración de la droga o placebo se realizó de la siguiente forma según el grupo:

- **Rama Tratada**: A los donantes, al inicio de la isquemia fría, se les administró una infusión de ALA (600 mg en 50 ml de NaCl durante 5 minutos) por la vena porta con el objetivo de administrarlo directamente al injerto. Posteriormente, una vez realizado el trasplante y previo a la reperfusión, se administró la infusión de ALA en el receptor, por la vena porta. Luego, se procedió al despinzamiento y a la reperfusión.

- **Rama Control**: en lugar de ALA, tanto los donantes como receptores recibieron un mismo volumen de solución fisiológica que el grupo tratado.

Es propicio aclarar que todos los pacientes recibieron la misma terapia de inducción y mantenimiento. El tratamiento de inducción consistió en corticoides durante la cirugía y Basiliximab en la terapia intensiva, repitiéndose la dosis de Basiliximab a los 4 días. La

terapia de mantenimiento consistió en: esteroides (meprednisona) en dosis decrecientes, Tacrolimus (Prograf) y Mofetil Micofenolato.

Una vez realizado el trasplante, se prestó especial atención al desarrollo de síndrome post-reperfusión severo, el cual se definió según los siguientes criterios:

Inestabilidad hemodinámica con hipotensión persistente (tensión arterial > 30% los valores de la fase anhepática), asistolia o arritmias que desencadenaron inestabilidad hemodinámica, necesidad de infusión continua de vasopresores. Aparición de fibrinólisis prolongada (más de 30 minutos) o recurrente (reaparición de fibrinólisis 30 minutos después de que haya sido resuelta).

4.2.2. RT- qPCR

El ARN total se aisló a partir de 10 biopsias (5 controles y 5 del grupo tratado) utilizando el Mini kit RNeasy (QUIAGEN), descripto previamente. La cuantificación y pureza del mismo se determinaron mediante la utilización del equipo Nanodrop. La retrotranscripción del ADNc fue realizada a partir de 1μg ARN total utilizando el kit "*RT2 First strand*" (QIAGEN), descripto previamente.

La amplificación y detección de ADNc en la PCR cuantitativa en tiempo real se llevó a cabo utilizando el reactivo *GoTaq® qPCR Master Mix*, en un formato de 96 pocillos en un equipo *Stratagene Mx 3000P*. El programa de ciclado fue: 95ºC por 2 min, 40 ciclos a 95ºC de 15 segundos y a 60ºC 45 segundos. Por último, un ciclo de 1 minuto a 95 ºC, 30 segundos a 55 ºC y 30 segundos a 95 ºC.

Los cebadores utilizados fueron diseñados y chequeados por el grupo de investigación. La especificidad fue evaluada mediante curva de fusión y corrida en gel de agarosa del resultado de la amplificación post-qPCR.

El análisis del resultado se llevó a cabo mediante el método 2^(-ΔΔCt), utilizando como gen control el 28S. A continuación, se enumeran las secuencias de los cebadores utilizados.

GEN	SECUENCIA
1. SLPI	5’ CTGGATCCTGTTGACACCCC
	3’ GGCACTTCTTGAAAGCCTGC
2. Mtor	5’ CGCGAACCTCAGGGCAA
	3’ ATTCCGGCTCTTTAGGCCAC
3. IL-6	5’ ATGAACTCCTTCTCCACAAGC
	3’ GTTTTCTGCCAGTGCCTCTTTG
4. BIRC2	5’ GTTTCAGGTCTGTCACTGGAAG
	3’ TGGCATACTACCAGATGACCA
5. Sestrin 2	5’ GCGAGATCAACAAGTTGCTGG
	3’ ACAGCCAAACACGAAGGAGG
6. IκBα	5’ TCGCAGTGGACCTGCAAAAT
	3’ TGAGCTGGTAGGGAGAATAGC
7. IL-8	5’ ACTGAGAGTGATTGAGAGTGGAC
	3’ AACCCTCTGCACCCAGTTTTC
8. REG3A	5’ CGCTGTCCCAAAGGCTCCAAG
	3’ GCACAGACACCAGGTTTCCAGAGG
9. PHD1	5’ TGCGGTACTACGGCATCTG
	3’ CCTCTGGCTCACTAGCTGC
10. PHD2	5’ GAAGGCGAACCTGTACCCC
	3’ CATGCACGGCACGATGTACT
11. HIF1A	5’ CAGCAACTTGAGGAAGTACC
	3’ CAGGGTCAGCACTACTTCG
12. CCR1	5’ GACTATGACACGACCACAGAGT
	3’ TACCAAGGAGTACAGAGGGGG
13. 28s	5’ AAC GAG ATT CCC ACT GTC CC
	3’ CTT CAC CGT GCC AGA CTA GAG

Tabla 13: Secuencia de cebadores utilizados para la amplificación de ADNc de biopsias hepáticas.

4.2.3. Medición de los niveles de SLPI y PAP (reg3a) plasmáticos.

Se determinaron los niveles de ambas alarminas mediante las técnicas ya descritas en sección 4.1.3 y 4.1.4.

4.3. PROTOCOLO ÁCIDO α-LIPOICO EN PACIENTES TRASPLANTADOS RENALES

4.3.1. Pacientes

Este protocolo ("Uso del ácido α–lipoico en trasplante renal") fue realizado en el Instituto de Nefrología, Nephrology de Buenos Aires y se reclutaron 22 pacientes. De los 22 pacientes reclutados, 8 pertenecieron al grupo control y 14 pacientes correspondieron al grupo tratado (tratamiento con ALA). En la rama activa (grupo tratado) la administración de ALA se realizó a través de una infusión de 12 ampollas de 50 mg de ALA (600 mg) diluido en 100 ml solución fisiológica que se pasaron durante 30 minutos, junto con la infusión de 1 ampolla de vitamina B (Bagó B1 B6 B12 o Becozym) endovenosa, en el quirófano previo al procedimiento quirúrgico del trasplante renal. Además, el riñón a trasplantar fue perfundido con una solución de Wisconsin conteniendo 600 mg de ALA (diluidos en 500 ml de solución fisiológico) entre 30-60 minutos previo al trasplante. Los pacientes del grupo control sólo recibieron 1 ampolla de vitamina B (Bagó B1 B6 B12 o Becozym) endovenosa previo al procedimiento quirúrgico del trasplante renal.

Los datos demográficos de los pacientes reclutados en la rama activa y control se muestran en la Tabla 14.

	Características	Grupo control	Grupo tratado	P<
Donante	Edad	54 (29-69)	60 (32-67)	Ns
	Creatinina	1,05 (1-3,8)	1,3 (0,5-5,1)	Ns
	IMC	31 (25-38)	25 (21-31)	Ns
Órgano	Tiempo isquemia fría (Horas)	15 (9-24)	18 (14-30)	Ns
Receptor	Edad	54 (26-69)	60 (32-66)	Ns
	Peso	76 (70-90)	75 (49-90)	Ns
	IMC	26 (24-31)	27 (24-33)	Ns
	Tiempo en diálisis (meses)	96 (48-408)	48 (12-140)	0.098

Tabla 14: Datos demográficos de los pacientes reclutados de la rama pasiva y la rama activa para el protocolo "Uso ácido lipoico en trasplante renal".

Como se observa en la Tabla 14, la única diferencia entre ambos grupos de pacientes reclutados corresponde al tiempo de diálisis previo, observándose que los pacientes del grupo tratado presentaban un menor tiempo en diálisis. Esta diferencia observada corresponde a un hecho fortuito ya que la elección de los pacientes para su inclusión en cada una de las ramas se realizó de manera aleatoria y ciega.

Con respecto al tratamiento de inducción, los pacientes recibieron ATG + MMF + Corticoides.

5. MODELOS ANIMALES DE DAÑO POR ISQUEMIA-REPERFUSIÓN

5.1. Animales

Se utilizaron veinticuatro ratas machos SPRague-Dawley de 8 semanas de vida de 200-300 gr (Bioterio de Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, y bioterio de Facultad de Bioquímica, UBA). Los animales se mantuvieron en condiciones estándar de ciclos de luz/oscuridad y con un libre acceso al agua y comida.

5.2. Procedimiento quirúrgico

Los animales se anestesiaron con Equitesan (0,96 % pentobarbital sódico, 4,02 % hidrato de cloral, 2,12 % sulfato de magnesio, 40 % propilenglicol, 10 % etanol. Dosis = 4ml/kg). Una vez anestesiados los animales, se realizó una laparotomía para localizar las arterias y venas renales de ambos riñones. Luego los vasos fueron bloqueados con pequeñas pinzas vasculares. El tiempo total de isquemia fue de 40 minutos. Luego se retiraron ambas pinzas permitiendo la reperfusión de sangre a los riñones. Finalmente se procedió a la sutura de la pared abdominal y la piel, en dos planos separados. Los animales se recuperaron de la intervención en condiciones estándar de luz/oscuridad. Veinticuatro horas post-isquemia, se volvió a anestesiar a los animales y se sacrificaron por exanguinación. Se obtuvieron muestras de sangre y ambos riñones fueron extraídos para su posterior estudio histopatológico.

5.3. Grupos experimentales

Se dividieron los animales en distintos grupos experimentales; en algunos de los cuales (ver más abajo) se les administró 3 dosis de 250 μg/kg de SLPI recombinante humano por vía intraperitoneal 24 horas antes a la isquemia, al momento de la isquemia y 6 horas posterior a la isquemia. Se evaluaron los siguientes grupos experimentales:

- **Grupo Sham** (n = 3): Animales con intervención quirúrgica, pero sin pinzamiento vascular.
- **Grupo Control** (n = 6): Animales con isquemia bilateral y administración i.p. del buffer utilizado en la diálisis del SLPI, en tres momentos diferentes en relación a la isquemia.
- **Grupo SLPI** (n = 6): Animales con isquemia bilateral y administración i.p. de 3 dosis de 250 μg/kg de SLPI, en tres momentos diferentes en relación a la isquemia.

5.4. Análisis de urea y creatinina plasmática

Se determinó la concentración de Urea y Creatinina plasmática en la sangre pre y postisquémica. La determinación de Urea y de Creatinina se realizó por el método de U.V. Cinética y colorimétrico-cinético, respectivamente (Mindray 300).

5.5. Histopatología renal

Los órganos fueron analizados por un patólogo al cual se le remitieron las muestras sin especificar el tipo de tratamiento realizado a los animales. Los riñones utilizados en los análisis histopatológicos se fijaron en una solución al 10% de paraformaldehído y se embebieron en parafina. Cortes de 4 μm de grosor fueron desparafinizados y se tiñeron con hematoxilina-eosina. Las secciones renales fueron examinadas en forma ciega para determinar el grado de necrosis cortical en células epiteliales tubulares. Las lecturas se realizan en al menos 10 campos diferentes de 1 μm^2 y la asignación de la severidad de la necrosis fue realizada mediante puntuaciones en una escala de 1 (<5%), 2 (5-25%), 3 (26-50%), 4 (51-75%) y 5 (> 75%).

5.6. Análisis de RT- qPCR

La determinación de transcriptos en las muestras de los riñones sometidos a isquemia y tratamiento se realizó a través de ensayos de RT- qPCR. Para lo cual se realizó un homogenato en seco utilizando nitrógeno (N) líquido de fragmentos (30 mg) de riñones guardados a -80 °C. Posteriormente se llevó a cabo la purificación de ARNm utilizando el kit RNeasy (QUIAGEN), descripto previamente.

Se cuantificó el ARN midiendo la absorbancia a 260 nm, y se determinó la pureza tal como fuera descripto más arriba. La retrotranscripción a ADNc fue realizada a partir de 0,7 μg de ARNm total utilizando el kit "*RT2 First strand*" (QIAGEN), descripto previamente. La amplificación y detección de ADNc en la PCR cuantitativa en tiempo real se realizó utilizando "*SYBER-green qPCR SuperMix universal*" (Invitrogen, Grand Island, NY). El programa de ciclado fue de 50ºC por 2 min, 95ºC por 10 min, 40 ciclos a 95ºC de 15 seg y por último 60 seg a 60ºC. La PCR en tiempo real se realizó con un formato de 96 pocillos en un equipo de Real-Time-PCR Applied Biosystems 7500.

El análisis de datos se basó en el método 2^(-ΔΔCt) con la normalización de los datos en relación a un gen control, en este caso, GAPDH. Los cebadores de cada gen fueron diseñados por nuestro grupo de investigación. Los cebadores utilizados fueron los siguientes:

GEN	SECUENCIA 5'	SECUENCIA 3'
rCD68	ACCATGAGGTTCCCTGTGTG	GTGGGAGAAACTGTGGCAT
rCD86	GGGAATCCTTTTCTCGGTGT	AGCCTGGTTATCCCTATCAAA
rCD14	ACTCTCAGAATCTACCGAC	GACCGCCGCCGTAGAACTCC
CCL2	AGACAGAGGCCAGCCCAGAAA	TTGAGCTTGGTGACAAATACT
CXCL2	CCTCCAGCAAGCTCCCTCCT	TTGGTAGGGTCGTCAGGCA

Tabla 15: Secuencia de cebadores utilizados para el modelo de daño por isquemia reperfusión animal.

6. MODELO ANIMAL DE DAÑO RENAL POR GENTAMICINA

6.1. Animales

Se utilizaron dieciséis ratas machos SPRague-Dawley de 8 semanas de vida de 200-300 gr (Bioterio de Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, y bioterio de Facultad de Bioquímica, UBA). Los animales se mantuvieron en condiciones estándar de ciclos de luz/oscuridad y con un libre acceso al agua y comida.

6.2. Protocolo experimental

En este caso los animales fueron divididos en cuatro grupos experimentales:

- **Grupo Control (n=4):** Animales que recibieron solución fisiológica.
- **Grupo Gentamicina(n=4)**: Animales que recibieron 4 dosis de gentamicina i.p. (60mg/kg).
- **Grupo Gentamicina+SLPI(n=4)**: Los animales recibieron 4 dosis de gentamicina (60mg/kg) y SLPI i.p. (250µg/kg).
- **Grupo SLPI(n=4):** Los animales recibieron 4 dosis de SLPI i.p. (250µg/kg).

Una dosis de tratamiento fue administrada por día durante 4 días, al 5to día se realizó la toma de muestra sanguínea para el análisis de urea y creatinina (descripto en sección 5.4.).

7. ROL DE SLPI EN PACIENTES TRASPLANTADOS RENALES

7.1. Obtención de plasma de pacientes

Se recolectaron muestras de sangre anticoagulada de 73 pacientes trasplantados renales. De los cuales 30 eran mujeres y 43 hombres. Con una edad promedio de 45,6±15,5 años. Dichos pacientes habían concurrido al Instituto de Nefrología, Nephrology de Buenos Aires para control de rutina. A su vez se incluyeron en el estudio 16 individuos sanos (7 mujeres y 9 hombres de 42,3± 7,3 años) y 25 pacientes en pre trasplante (11 mujeres y 13 hombres de 56,5 ± 14,0 años). De los 73 trasplantados, 55 se encontraban con terapia inmunosupresora de mantenimiento con inhibidor de calcineurina + micofenolato mofetil (MMF) + esteroides, y 18 con inhibidor de mTOR + MMF + esteroides.

El plasma se obtuvo por centrifugación de la sangre, en tanto que los leucocitos se obtuvieron a través de un gradiente, tal como se describe más abajo. En el plasma se determinaron los niveles de SLPI, REG3a y citoquinas según lo descripto previamente, así como también se midieron los metabolitos que se miden de rutina para evaluar la función renal (creatinina, urea).

7.2. Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (CMSP)

A partir de sangre fresca diluida al medio con solución fisiológica se llevó a cabo el protocolo de aislamiento de CMSP. Para esto se colocó la sangre heparinizada diluida sobre Ficoll-Hypaque (GE, Healthcare) en relación 4:1; se centrifugó durante 20 min a 2000 rpm, recuperándose posteriormente, el halo de células. La viabilidad celular se evaluó realizando una tinción con azul de tripán.

El cultivo de las células *in vitro* se llevó a cabo en medio RPMI 10% de suero bovino fetal decomplementado (SBF, Gibco), glutamina y penicilina/estreptomicina (100μg/ml).

7.3. Ensayos de proliferación celular

En una placa de cultivo de 96 pocillos de fondo en U se colocaron $1x10^5$ CMSP resuspendidas en medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco), suplementado con 10 % de SBF (Gibco), L-glutamina (2mM) y penicilina/estreptomicina (100μg/ml).

La proliferación fue inducida con PHA (4 μl/pocillo) en presencia o ausencia de SLPI, durante 5 días, a 37 ºC con 5 % CO_2. Al 4to día se colocó timidina tritiada, cosechándose las células a las 24 hs. Se realizó la lectura de la radioactividad con un contador de centelleo líquido (Wallac 1214 Rackbeta). Los resultados se expresan como índice de proliferación (c.p.m basal/c.p.m PHA * 100).

7.4. Aislamiento de monocitos a partir de CMSP

Una vez aislados las CMSP se procedió a realizar una purificación positiva de monocitos. Para la cual, las células se incubaron durante 40 min a 4°C con un anticuerpo anti-CD14 (BD Biosciences). Posteriormente fueron lavadas (PBS 2%SBF, Gibco) e incubadas en una proporción 1:2 durante 45 min a 4°C con perlas magnéticas (Dynabeads) acopladas a un anticuerpo anti-fracción constante. Una vez cumplido el tiempo, se procedió a aislar los monocitos colocando el tubo en un imán. Luego de sucesivos lavados con PBS 2 % SBF, las células fueron resuspendidas en medio RPMI 10% SBF. La pureza fue confirmada realizando un estudio de marcación por citometría de flujo. En la mayoría de los casos, se obtuvo una pureza de 97% de células $CD14^+$.

8. CULTIVO DE LÍNEAS CELULARES

La línea celular utilizada en esta tesis es una línea de células de túbulo proximal de riñón humano denominada HK-2. Estas células se mantuvieron *in vitro* en medio de cultivo Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) y Medio HAM F12 (F12) en partes iguales con 10% SBF, glutamina y penicilina/estreptomicina (100μg/ml). El medio de mantenimiento fue el mismo que el utilizado en los experimentos con dicha línea.

8.1. Ensayo de apoptosis celular

Para estos experimentos, 60.000 células HK-2 fueron sembradas en placas de 12 pocillos y se dejaron adherir por 18h. Luego se sincronizaron cambiando el medio a medio sin suero durante 24 horas. Finalmente se agregó el medio completo y los diferentes tratamientos por otras 24 horas. Las células fueron desadheridas con tripsina (Gibco) y, la actividad enzimática se detuvo agregando SBF. La medición de la apoptosis/necrosis se realizó marcando las células con un kit de Anexina-yoduro de propidio (BD Pharmigen) y la adquisición se realizó utilizando un citómetro de flujo FACSCalibur.

8.2. Ensayo de MTT

Las células se sembraron en pocillos de placas de 96 con medio DMEM:F12 10% SBF y se dejaron adherir una noche. Al día siguiente se las sincronizó con medio sin suero por 24 h. Luego se agregaron los tratamientos por 24h. Se retiró el sobrenadante y se agregó una solución de PBS con 500μg/ml de bromuro de 3-(4 5-dimetiltiazol-2-il)-2 5-difeniltetrazolio, durante 4h a 37°C. Posteriormente se retiró el sobrenadante y se agregó dimetilsulfóxido para la disolución del precipitado. La absorbancia fue leída a 570nm en lector de placas.

8.3. Microarreglo de muerte celular

Se sembraron 500.000 células HK-2 en placas de 25cm^2 y se dejaron adherir por 18h a 37°C. Luego se sincronizaron cambiando el medio DMEM:F12 10% SBF a medio sin suero durante 24h. Finalmente se agregó el medio completo y los diferentes tratamientos. Los grupos experimentales fueron: células sin tratamiento en medio completo; células con

FK506 10μM; células con FK506 10μM + SLPI 0,4μg/ml. Las células fueron incubadas durante 24hs a 37°C. Al finalizar el tiempo de incubación, se obtuvo el sobrenadante y se lavaron las células con solución fisiológica. Además, se recuperaron las células del sobrenadante, a las que se les agregó las células adheridas a la placa y que fueron despegadas con tripsina. Una vez cortada la actividad de la tripsina con suero, las células fueron centrifugadas 10min a 1000rpm. Luego de realizar varios lavados, las células fueron contadas colocándose la misma cantidad de células por tratamiento y dejando el pellet sin sobrenadante a -70°C. Luego se procedió a la extracción de ARN por columnas de QIAGEN, mencionadas previamente. Una vez realizada la extracción se midió la concentración del RNA por Nanodrop y se utilizó 0,5 μg de ARN para pasar a ADNc. Posteriormente se realizó la retrotranscripción con el kit "RT2 *First Strand*" (QIAGEN). Finalmente, se utilizó el microarreglo "*Human Stress & Toxicity Pathway Finder PCR Array*" (QIAGEN), similar al utilizado previamente en los pacientes con DGF. El kit permite el estudio de una serie de genes vinculados a procesos de hipoxia, estrés oxidativo, estrés osmótico, muerte celular, respuesta inflamatoria, señales de daño del ADN y proteínas de estrés térmico además de poseer controles internos como control de ADN genómico, controles positivos y negativos.

Lista de genes que se estudian con el kit "*Human Stress & Toxicity Pathway Finder PCR Array*":

Estrés Oxidativo: FTH1, GCLC, GCLM, GSR, GSTP1, HMOX1, NQO1, PRDX1, SQSTM1, TXN, TXNRD1.

Hipoxia: ADM, ARNT, BNIP3L, CA9, EPO, HMOX1, LDHA, MMP9 (Gelatinase B), SERPINE1 (PAI-1), SLC2A1, VEGFA.

Estrés Osmótico: AKR1B1, AQP1, AQP2, AQP4, CFTR, EDN1, HSPA4L, NFAT5, SLC5A3.

Muerte celular:

Apoptosis: CASP1 (ICE), FAS, MCL1, TNFRSF10A, TNFRSF10B (DR5), TNFRSF1A.

Autofagia: ATG5, ATG7, ATG12, BECN1, FAS, ULK1.

Necrosis: FAS (TNFRSF6), GRB2, PARP1 (ADPRT1), PVR, RIPK1, TNFRSF10A, TNFRSF1A, TXNL4B.

Respuesta Inflamatoria: CCL2 (MCP-1), CD40LG (TNFSF5), CRP, IFNG, IL1A, IL1B, IL6, IL8, TLR4, TNF.

Señal de daño del ADN:

Punto de control del ciclo celular: CDKN1A (p21CIP1/WAF1), CHEK1, CHEK2 (RAD53), DDIT3 (GADD153/CHOP), HUS1, MRE11A, NBN (NBS1), RAD17, RAD9A.

Otras respuestas: ATM, ATR, DDB2, GADD45A, GADD45G, RAD51, TP53, XPC.

Proteínas de estrés térmico /respuesta a proteínas mal plegadas: ATF4, ATF6, ATF6B, BBC3, BID, CALR, DDIT3, DNAJC3, HSP90AA1, HSP90B1 (TRA1), HSPA4 (HSP70), HSPA5 (GRP78).

9. PRODUCCIÓN DE SLPI RECOMBINANTE HUMANO

9.1. Expresión de SLPI

Para la producción de SLPI se utilizaron *E. Coli* BL21-Codon Plus-RIL (Stratagene) almacenadas a -70ºC, transformadas con un plásmido que contiene el gen de SLPI bajo un promotor inducible por IPTG, generadas en nuestro laboratorio [206]. Se obtuvo un precultivo inoculando 7,5 ml de medio LB (Luria Broth) estéril con ampicilina (100 µg/ml) y cloranfenicol (50 µg/ml) a 37ºC, durante toda la noche en agitación. Al día siguiente se agregaron a 500 ml de LB con ampicilina (100 µg/ml) y cloranfenicol (50 µg/ml) 5 ml del precultivo anterior, dejando crecer las bacterias en agitación constante a 37ºC hasta alcanzar una densidad óptica de 0,6 medida a 600 nm. Una vez 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 horas a una temperatura de 28ºC con agitación constante. Luego, el cultivo se centrifugó a 7.000 rpm durante 7 minutos y el pellet fue fraccionado y almacenado a –20ºC para su posterior purificación.

9.2. Purificación de SLPI

Se llevó a cabo la resuspensión de cada pellet en 2 ml de buffer de lisis (W10: NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 1M, Imidazol 10 mM; pH 8) llevándolo todo a un mismo tubo y se agregó lisozima hasta llegar a una concentración final de 1mg/ml, dejándola actuar 30min. Posteriormente las bacterias fueron lisadas por ultrasonido con 7 pulsos de 60 Watts de 1 minuto en un sonicador. Todo el procedimiento se realiza en hielo para evitar la proteólisis. Luego el lisado se centrifugó a 10.000 rpm durante 30 minutos a una

temperatura de 4ºC, para obtener el sobrenadante rico en SLPI. A 1000 µl de resina de Níquel-ácido nitrilotriacetico (Ni-NTA), previamente equilibrada con buffer de lisis se le agregó la fracción soluble y se dejó a 4ºC 1h. Durante este tiempo se produce la unión de la cola de 6 histidinas del SLPI al Ni^{+2} unido a la resina. Luego de la incubación se realizó una centrifugación descartando lo no retenido.

Soluciones con distintas concentraciones de Imidazol fueron utilizadas de forma creciente debido a que el Imidazol compite con el SLPI por la unión a la resina y lo desplaza. En primer lugar, se realiza un lavado de 15 ml con W20 (NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 1M, Imidazol 20 mM; pH 8), otro con 15 ml de W40 (NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 1M, Imidazol 40 mM; pH 8), otro lavado con 6 ml de W60 (a diferencia de las demás es 1/40 W250 en etanol 75%) y dos lavados con 2 ml de W75 (NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 1M, Imidazol 75 mM; pH 8), por último, se hicieron 6 lavados de 2 ml con W250 (NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 1M, Imidazol 250 mM; pH 8). De cada sobrenadante obtenido se guardó 1 ml. Los sobrenadantes obtenidos del W250, son los que contenían SLPI y fueron almacenados a 4ºC

9.3. Detección del SLPI mediante SDS-PAGE.

Se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida (18%) en condiciones desnaturalizantes para las muestras obtenidas en la purificación del SLPI. Cada una de las muestras correspondientes a los diferentes pasos de la expresión y purificación fueron tratadas con buffer de siembra (0,5% SDS, 1,5% glicerol) y β-mercaptoetanol. Las proteínas se desnaturalizaron por calor (95ºC, 5 minutos). La corrida se realizó a 100 V durante 50 minutos aproximadamente y luego el gel fue teñido con *Coomasie-blue* durante 30 minutos. Sucesivos lavados con una solución al 7% de ácido acético permitió visualizar las bandas en las calles sembradas.

El SLPI así obtenido se encontraba en una solución 250 mM de Imidazol. 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).

9.4. Diálisis del 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 realizó sucesivos lavados con agua para su activación. Las elusiones del SLPI en W250 (12 ml) se juntaron y pusieron dentro de la membrana. Las elusiones fueron dializadas

durante 16 hs a 4ºC en una solución 50 mM NaH_2PO_4, 300 mM NaCl, pH 7,6 para obtener al final de la diálisis al SLPI en buffer 50 mM NaH_2PO_4, 300 mM NaCl y 2,5 mM Imidazol a un pH de 7,6.

Luego la muestra con SLPI se pasó 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).

9.5. Cuantificación de la concentración de proteína

Se construyó una curva de calibración con diluciones seriadas de BSA (0-1000 µg/ml) en buffer de diálisis. En microplacas de 96 pozos (fondo plano) se colocó 25 µl de las diluciones de BSA y las distintas diluciones de SLPI. Luego se agregaron 25 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 1hs a 37º C y posteriormente se leyó a 550 nm en el lector de microplacas de ELISA. Se graficó una curva de concentración en función de la densidad óptica. Finalmente, se obtuvo el valor de la concentración de proteínas calculando con la pendiente y la ordenada al origen de la curva como [Proteína]= (DO550 mm de Proteína-Bco±ordenada)/pendiente. Como producto final de las distintas purificaciones realizadas se obtuvieron soluciones proteicas en concentraciones que variaron entre 90 y 350 µg/ml diluidas en buffer 50 mM NaH_2PO_4, 300 mM NaCl, 2,5 mM Imidazol a un pH de 7,6. Posteriormente se realizaron los ensayos de Western Blot y sándwich ELISA para determinar la presencia del SLPI, en la solución proteica obtenida. Además, el SLPI generado fue evaluado en su capacidad para inhibir la acción de la tripsina en los ensayos de actividad inhibitoria.

9.6. Actividad antiserinproteasa

Para determinar la actividad inhibitoria de serín proteasas del SLPI, se realizó un ensayo de inhibición de Tripsina. Para lo cual se utilizó el sustrato cromogénico Nsuccinil–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 a diferentes concentraciones (1/2, 1/5, 1/10, 1/50) con tripsina (0,02 – 0,05 %) 5 minutos a 37ºC. Finalmente se agregó 40 µl de una solución que contiene el

sustrato cromogénico diluido 1 en 80 en buffer Tris (50 mM) pH 7,4. La absorbancia se midió a 405 nm cada 2 minutos durante 20 minutos.

Todo el SLPI recombinante humano utilizado en el transcurso de esta tesis fue chequeado en su pureza y actividad inhibitoria de serín proteasas, así como también en su actividad biológica, la cual fue evaluada realizando ensayos de proliferación leucocitaria descriptos en la sección 9.ii de materiales y métodos.

10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En cada gráfico se indica específicamente el test estadístico utilizado considerándose como significativo un valor de $p \leq 0,05$ (*); $p \leq 0,01$ (**) y $p \leq 0,001$ (***). Toda la estadística se analizó utilizando el programa “GraphPad Prism”. Cuando se quiso analizar correlaciones se utilizaron la prueba del coeficiente de correlación de Spearman para datos no paramétricos y de Pearson para datos paramétricos. Se realizó ANOVA de una vía seguido con *pos hoc* Dunnett para comparaciones múltiples y Prueba de Kruskal-Wallis con test *post hoc* Dunn para datos no paramétricos. Cuando se analizaron datos paramétricos y no pareados se utilizó la Prueba de t y la Prueba de Mann Whitney para el caso de no paramétricos. Los gráficos fueron generados por GraphPad Prism (GraphPad, Inc., La Jolla, CA).

Resultados

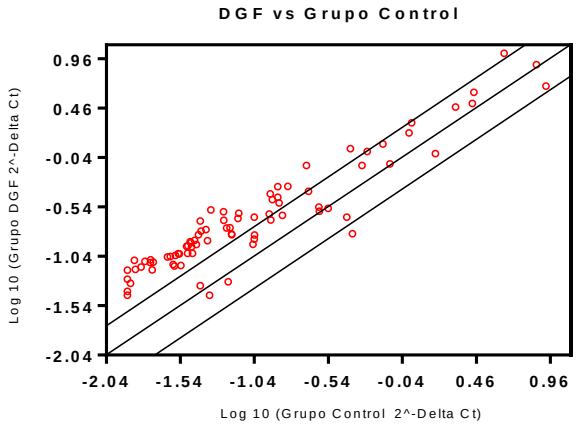
1. EVALUACIÓN DE MEDIADORES INFLAMATORIOS EN EL RETRASO EN LA FUNCIÓN DEL INJERTO

1.1. Niveles diferenciales de ARNm en biopsias renales de pacientes trasplantados con y sin DGF

Como fue dicho en la introducción el DGF es un fenómeno de gran implicancia clínica que se observa en los pacientes trasplantados renales con repercusiones a corto y largo plazo en la sobrevida del injerto. Al respecto se han estudiado diferentes facetas del fenómeno, siendo uno de los aspectos más destacados su vinculación con el TIF[207]. Dada la gran incidencia de DGF en nuestro país, uno de nuestros objetivos iniciales fue estudiar la presencia de marcadores génicos diferenciales en las biopsias renales entre aquellos pacientes que desarrollaban DGF *vs* los que no desarrollaban DGF. La estrategia utilizada para este estudio fue realizar inicialmente un microarreglo de mediadores inflamatorios en biopsias de protocolo en 16 pacientes trasplantados renales con criterio expandido, 8 de los cuales habían sufrido DGF. Las biopsias se realizaron al 7mo día posterior al trasplante. Se llevó a cabo la extracción de ARN, su retrotranscripción a ADNc, y por último se realizaron los microarreglos (RT- qPCR) para determinar los niveles de expresión de mediadores de la respuesta inmune, tal como se describió en la sección “materiales y métodos”.

Mediante la utilización de un programa sugerido por la empresa (QIAGEN, Hilden, DE) se realizó un gráfico de dispersión de expresión relativa de transcriptos que se muestra en la Figura 7A. En esta Figura se grafican los valores de expresión relativa de pacientes con DGF (grupo 1) sobre la ordenada y en la abscisa se representan los valores de expresión relativa de pacientes sin DGF (grupo 2). Cada símbolo representa un gen y aquellos que se encuentran por fuera de los límites representan un aumento o disminución de los niveles de transcripto en los pacientes con DGF con respecto a los pacientes sin DGF. De un total de 84 genes analizados, 58 mostraron un aumento de la expresión mientras que solo uno se encontró disminuido en las biopsias provenientes de pacientes con DGF (Figura 7A).

A



B

Expresión	Mediadores	Indice de Cambio
Aumento	IL-1R1	4,9
	IL-10	4,8
	IFNA1	4,4
	IL-1F7	4,3
	HMOX-1	2,9
Disminución	TGF-β	3,3

Figura 7: Expresión de ARNm en biopsias renales de pacientes trasplantados renales con criterio expandido. Se analizaron 16 muestras de ARNm de pacientes con trasplante renal. Después de la normalización con los genes control se obtuvo un índice para cada gen evaluado y se compararon entre los grupos con DGF y sin DGF. A) Gráfico de dispersión de expresión relativa de transcriptos. Cada símbolo representa un gen. Aquellos por fuera de los límites representan el doble de aumento o disminución de la expresión en los pacientes con DGF vs sin DGF. B) Mediadores que mostraron mayor variación en el índice de cambio.

De todos los genes analizados, los que mostraron un mayor índice de cambio fueron: IL-1R1, IL-10, IFNA1, IL-1F7 y HMOX-1(Figura 7B). Por el contrario, solo la expresión de TGF-β se vio disminuida en los pacientes con DGF (Figura 7B). Con el fin de confirmar los resultados obtenidos en el microarreglo llevado a cabo con tan sólo 16 pacientes, se prosiguió a realizar RT- qPCR para los genes que mostraron mayor diferencia en sus niveles de transcripto, en un mayor número de pacientes. Para esto se utilizaron 34 nuevas biopsias provenientes de 11 de pacientes sin DGF y 23 de pacientes con DGF.

Aunque no fue posible detectar algunos de los genes detectados con el microarreglo, en todas las biopsias analizadas los resultados obtenidos confirmaron que los niveles de transcripto de IL-1R1 (Figura 8A), IFNA1 (Figura 8B) y HMOX-1 (Figura 8C) era mayor en las biopsias de pacientes que habían sufrido DGF. También se pudo confirmar que la expresión de TGF-β (Figura 8D) se encontraba disminuida en los pacientes con DGF en comparación con los pacientes que no sufrieron DGF. Sin embargo, no se encontró una diferencia significativa en la expresión de IL-10 (Figura 8E) ni IL-1F7 (Figura 8F) entre ambos grupos de pacientes.

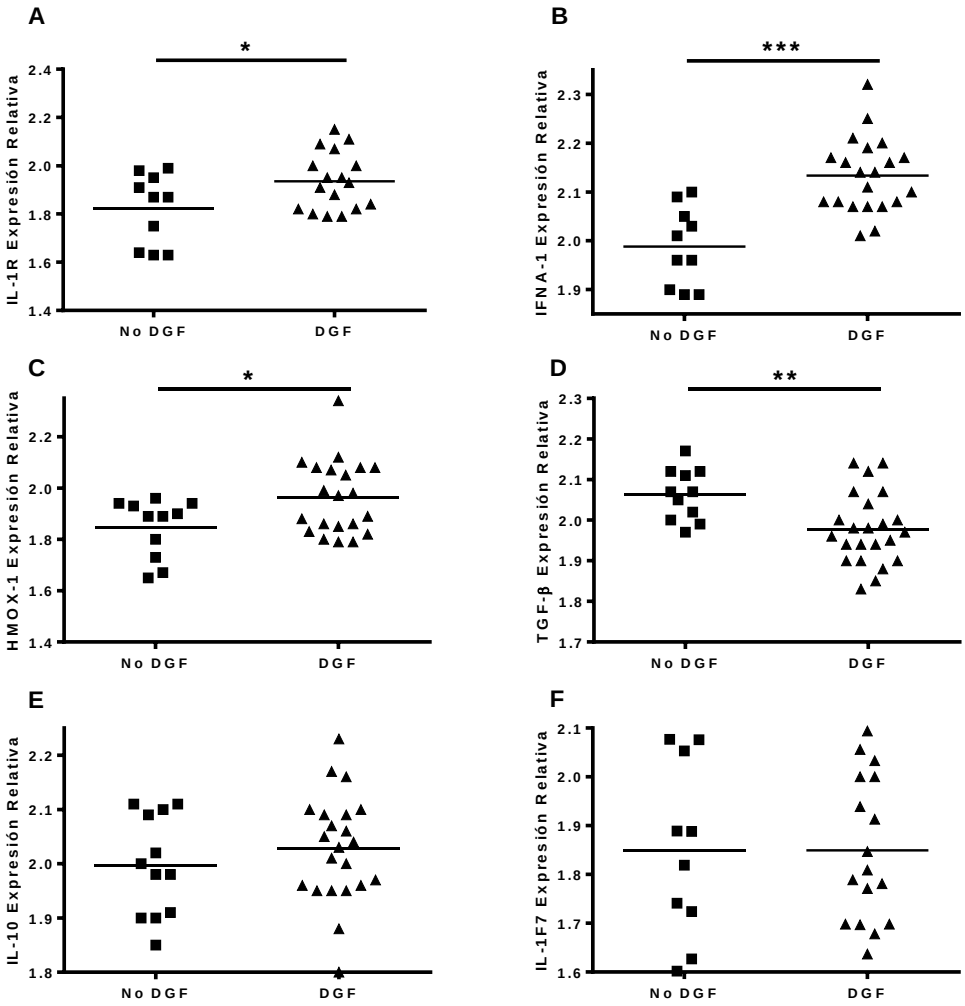


Figura 8: Niveles de transcripto de mediadores inflamatorios en biopsias de pacientes trasplantados renales con criterio expandido. Se analizaron 34 muestras de ARN de biopsias renales de 11 pacientes que no sufrieron DGF y 23 pacientes con DGF. La expresión relativa de todos los genes se calcula como 2^[(Ct gen de referencia) - (Ct gen target)].*P < 0,05, **P< 0,01 y ***P < 0,001 Prueba de Mann Whitney.

1.2. Factores de riesgo asociados a los niveles de transcripto.

Con el fin de determinar si las diferencias observadas en los niveles de transcriptos en las biopsias podrían estar relacionadas con características específicas de los donantes, del proceso de procuración (como ser el TIF) o con características de los receptores del trasplante, se analizó la existencia de correlaciones de dichas características con los niveles de ARNm. La evaluación de las correlaciones se llevó a cabo únicamente con los

genes que mostraron niveles diferenciales de transcriptos entre los grupos de pacientes con DFG y sin DGF. Las características estudiadas de los donantes fueron la edad, los niveles séricos de creatinina pre-ablación y el índice de masa corporal (IMC). El análisis de los resultados mostró una correlación negativa de los niveles de TGF-β con la edad del donante (Figura 9A) y los niveles de creatinina pre-ablación (Figura 9B). No se observó correlación alguna entre el IMC y los genes analizados (dato no mostrado).

Al analizar el TIF como parámetro vinculado al proceso de procuración, no se pudo observar asociación alguna entre los genes estudiados y dicho parámetro (dato no mostrado). Este resultado fue inesperado debido a los antecedentes existentes en la literatura que vinculan al DGF con el TIF [73].

Luego se analizaron las características del receptor, tales como la edad, el IMC y el tiempo en diálisis. En este caso pudimos determinar que la expresión de TGF-β tenía una correlación negativa con la edad del receptor (Figura 9C). Por otra parte, encontramos una correlación positiva entre IFNA1 y el IMC del receptor (Figura 9D), pero no se observaron correlaciones entre los genes y el tiempo en diálisis del receptor (dato no mostrado).

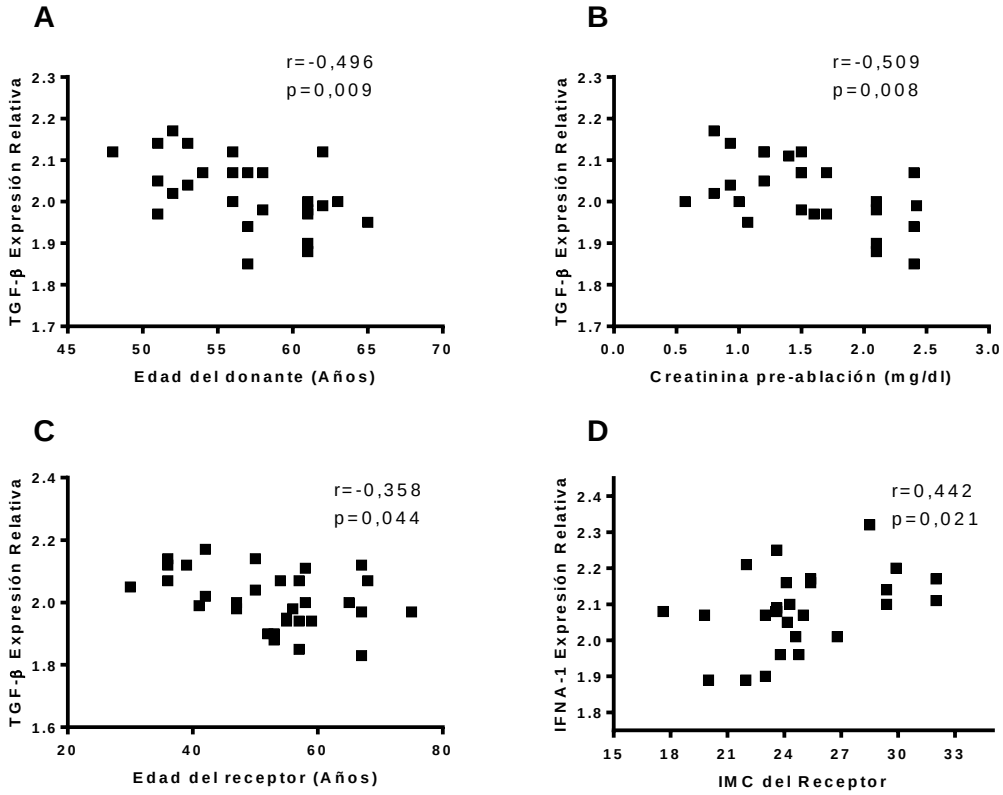


Figura 9: Correlación entre la expresión relativa de ARNm y factores de riesgo del donante y el receptor. Se calcula el coeficiente de correlación de Spearman (dos colas). En la figura se muestran: (A) TGF- β *versus* edad del donante. (B) TGF-β *versus* los niveles de creatinina pre-ablación. (C) TGF- β *versus* la edad del receptor. (D) IFNA-1 *versus* el índice de masa corporal del receptor.

1.3. Características clínicas de pacientes con y sin DGF asociadas a los niveles de transcripto.

Por último, se quiso estudiar la presencia de asociaciones entre los mediadores inflamatorios con marcadores tempranos (primeros dos días) de función renal post-trasplante. Se pudo observar que IFNA-1 se correlacionó de manera directa con el índice restrictivo renal medido por Ultrasonografía Doppler y mostró una tendencia de correlación indirecta con la diuresis (Figura 10A y 10B). En el caso de HMOX-1, se observó una correlación positiva con la glucemia (Figura 10C). Finalmente, para TGF-β encontramos una correlación positiva con la diuresis (Figura 10D), mientras que se

observó una correlación negativa con la glucemia (Figura 10E) y el índice restrictivo renal medido por Ultrasonografía Doppler (Figura 10F).

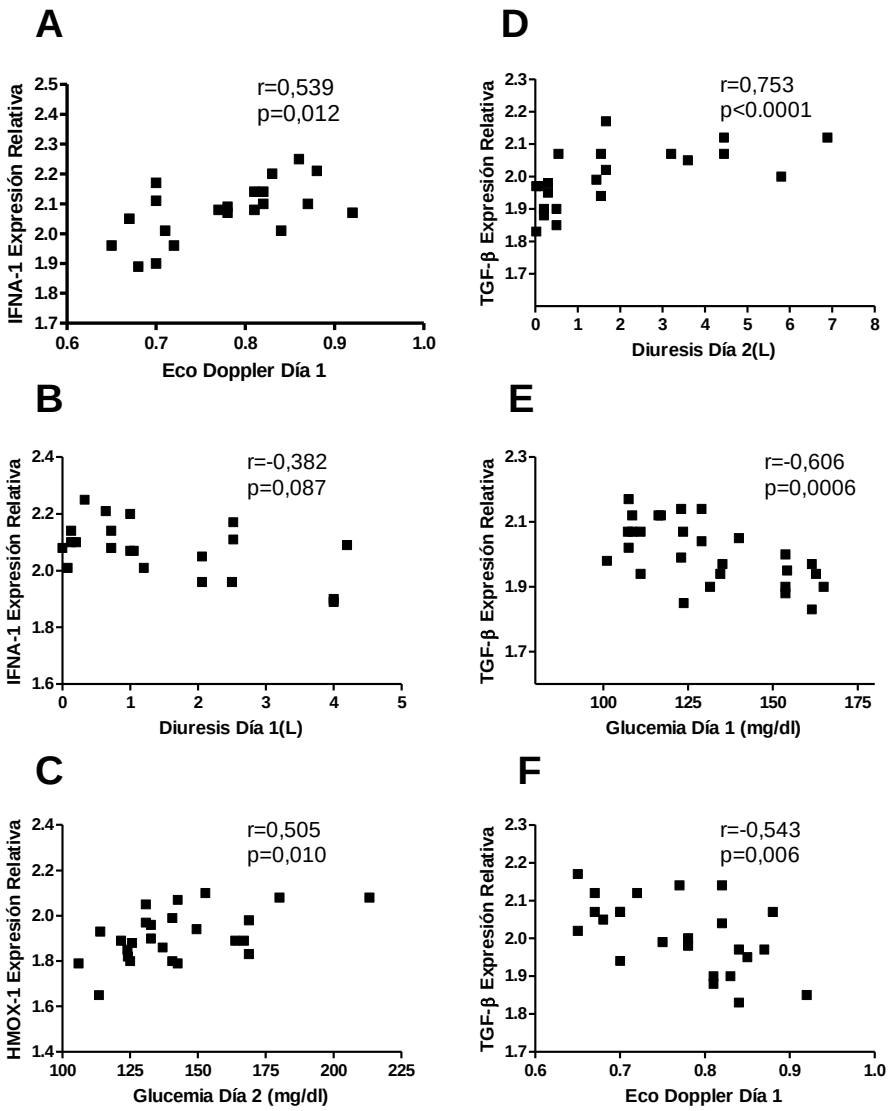


Figura 10: Correlación entre la expresión relativa de ARNm y parámetros de funcionamiento renal. Se calcula el coeficiente de correlación por rangos de Spearman (dos colas). En la figura se muestran: (A) IFNA-1 *versus* Eco Doppler al día 1 post trasplante. (B) IFNA-1 *versus* Diuresis al día 1. (C) HOMX-1 versus glucemia al día 2. (D) TGF- β *versus* diuresis al día 2. (E) TGF- β *versus* glucemia al día 1. (F) TGF- β *versus* Eco Doppler al día 1.

Es importante destacar que como era esperado y ha sido descripto, existieron diferencias significativas en los parámetros clínicos a largo plazo (supervivencia de los pacientes y la función del injerto) entre los pacientes que presentaron DGF y los que no sufrieron DGF. El análisis a tres años post-trasplante mostró que el 91% de los pacientes del grupo sin

DGF estaban vivos y con buena función renal. En cambio, en el grupo de pacientes que sufrieron DGF, tan sólo el 74 % de los pacientes estaban vivos con función renal normal. Estos resultados, en conjunto, nos muestran que es posible detectar a tiempos tempranos determinados mediadores que parecen estar vinculados al posterior funcionamiento del órgano.

2. EL SLPI COMO BIOMARCADOR EN EL LÍQUIDO DE PERFUSIÓN

Los marcadores génicos evaluados en la sección anterior, fueron examinados en biopsias renales obtenidas al 7mo día post-trasplante. Considerando que el DGF es un fenómeno que tiene lugar en la primer semana post-trasplante y que existen parámetros derivados del donante (edad y creatinina pre-ablación) que están vinculados a la aparición del DGF, hipotetizamos que, además de los datos demográficos y clínicos ya mencionados, podrían existir marcadores inflamatorios del órgano a injertar, previo al trasplante, que pudieran predecir la aparición de DGF. Para evaluar esta hipótesis nos encontramos frente a la disyuntiva sobre el tipo de muestra a utilizar. Entre las opciones barajadas consideramos medir parámetros en el plasma del donante, biopsias del órgano a trasplantar previo a la cirugía o en el líquido de perfusión proveniente del órgano a trasplantar. De todas ellas optamos por el líquido de perfusión del órgano ya que ofrecía ventajas metodológicas y prácticas. El siguiente problema con el que nos enfrentamos fue saber cuál era el mejor metabolito a analizar en el líquido de perfusión y que reflejara el estado del riñón. En este sentido, nosotros conocíamos que el SLPI era un factor de alarma producido por las células epiteliales frente a señales de daño. Por lo tanto, decidimos examinar los niveles de SLPI en el líquido de perfusión como posible indicador predictivo del funcionamiento renal post-trasplante.

Para llevar a cabo estas mediciones, se obtuvo el líquido de perfusión que habitualmente se utiliza para lavar los riñones, previo al trasplante. En detalle, el procedimiento de recolección del líquido de perfusión consiste en perfundir a los órganos que se encuentran en frío, con un volumen de 500 ml de solución de preservación. De estos 500 ml, se conservaron los 50 ml iniciales (SLPI-A) y los 50 ml finales (SLPI-B). El líquido fue congelado, hasta la medición de los niveles del mediador SLPI en el laboratorio, realizando un ensayo de sándwich ELISA.

Los resultados mostraron que no hubo diferencias significativas en los valores de SLPI entre órganos provenientes de donantes mujeres y hombres (dato no mostrado). Sin embargo, se pudo observar una correlación directa entre el nivel de SLPI y la edad del donante, siendo estadísticamente significativa cuando se usa SLPI-B (Figura 11B). Lo mismo se pudo contemplar con el índice de KDPI (índice generado con parámetros demográficos del donante y utilizado con el fin de determinar la calidad de los riñones) y los valores de SLPI-B (Figura 11D). Así mismo, se observó una tendencia de correlación directa entre el IMC del donante y SLPI-B (Figura 11F). Por otro lado, no se vio relación entre SLPI-A y SLPI-B con el TIF ni con la creatinina pre-ablación (Tabla 16).

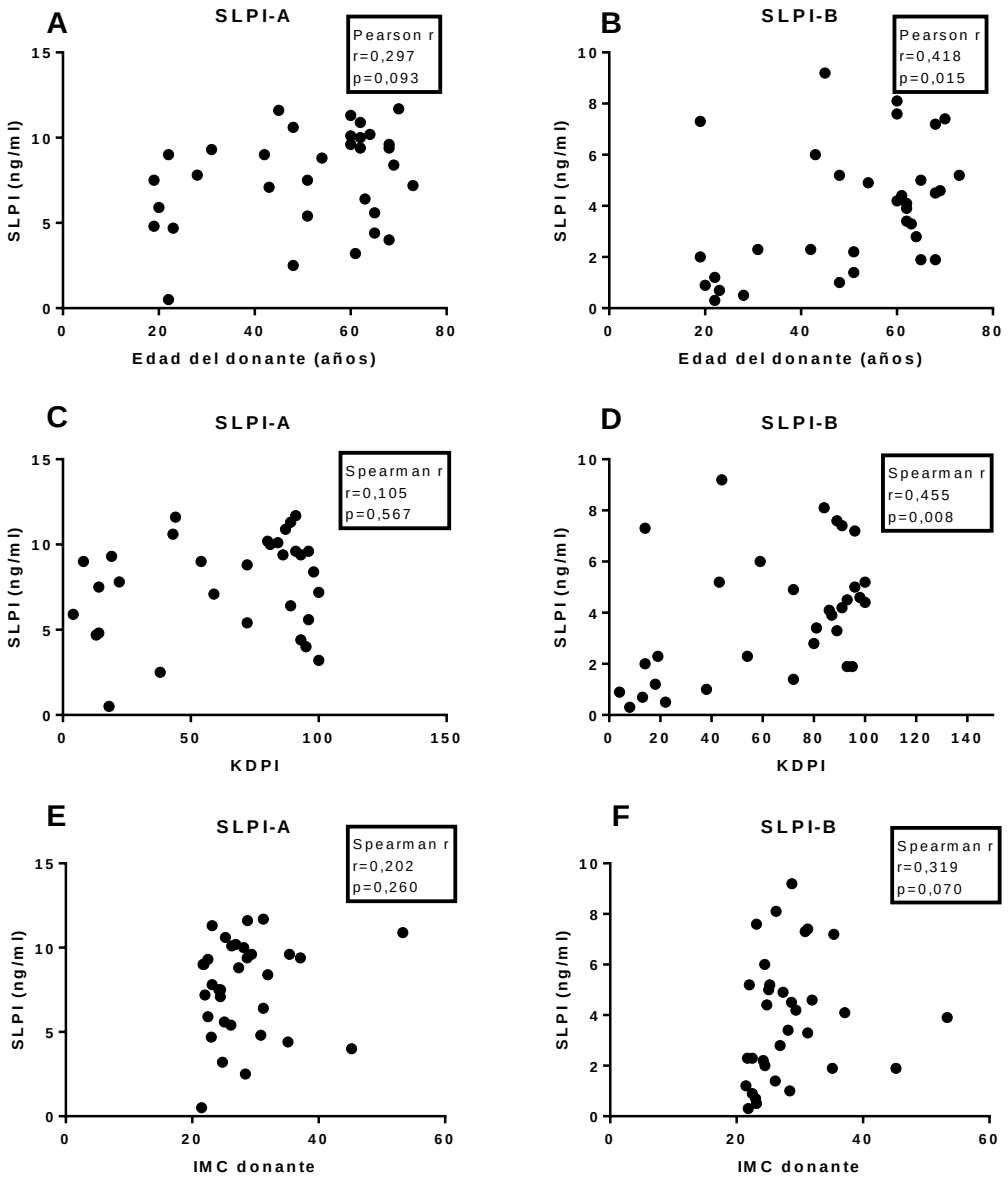


Figura 11: Correlación entre los niveles de SLPI en el líquido de perfusión con parámetros demográficos y clínicos del donante. Se evaluaron, mediante un ELISA sándwich, los niveles de SLPI en líquido de perfusión de 34 riñones que posteriormente fueron trasplantados. Coeficiente de correlación de Pearson para variables paramétricas y de Spearman para datos no paramétricos (dos colas).

		SLPI-A	*SLPI-B*
Creatinina	r=	0,009	0,254
pre- ablación	p=	0,959	0,154
TIF (h)	r=	0,055	0,089
	p=	0,760	0,620

Tabla 16: Correlación entre el TIF (Tiempo de isquemia fría) y valores de creatinina pre-ablación (mg %) con los niveles de SLPI (ng/ml) en líquido de perfusión. Se evaluaron, mediante un ELISA sándwich, los niveles de SLPI en líquido de perfusión de 34 riñones que posteriormente fueron trasplantados. Coeficiente de correlación de Spearman (dos colas).

Luego, se quiso evaluar la capacidad que tenía la determinación del SLPI en el líquido de perfusión de predecir la aparición de DGF. Para lo cual, de manera retrospectiva, se agruparon a los pacientes según la aparición o no de DGF, y se compararon los niveles de SLPI encontrados en el líquido de perfusión previo al trasplante. De esta manera se pudo observar que aquellos pacientes que presentaron DGF tuvieron valores significativamente mayores de SLPI en los últimos 50 ml (SLPI-B) de líquido de perfusión (Figura 12).

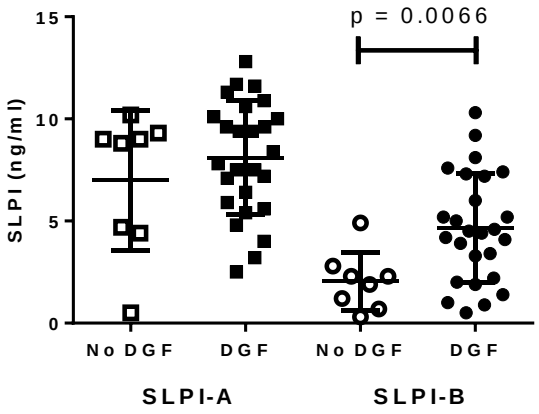


Figura 12: Niveles de SLPI en líquido de perfusión en pacientes que presentaron o no DGF. Se dividió el total de pacientes trasplantados en aquellos que sufrieron DGF y aquellos que no. A su vez se evaluaron los niveles de SLPI en el líquido de perfusión de los órganos que fueron trasplantados. Prueba de *t* para datos no pareados. **P ≤ 0.01.

Al evaluar los resultados a largo plazo, observamos que los pacientes que sufrieron episodios de rechazo en los primeros 6 meses post-trasplante tuvieron niveles mayores

de SLPI-A y SLPI-B en comparación con aquellos que no lo habían sufrido (Figura 13). Es importante señalar, que para este análisis sólo se muestran los datos de aquellos pacientes que han cumplido los 6 meses post-trasplante. Por lo tanto, estos datos serán confirmados una vez que todos los pacientes hayan cumplido los 6 meses post-trasplante.

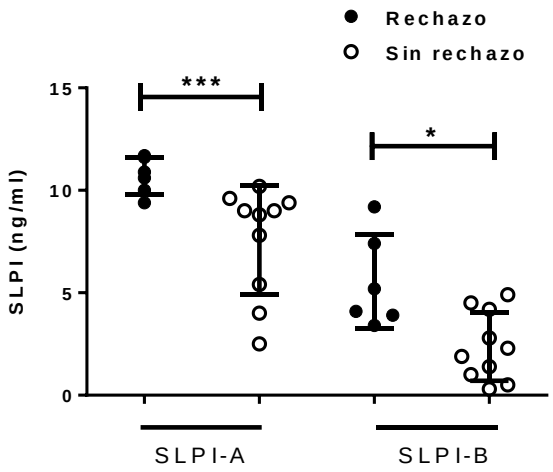


Figura 13: Niveles de SLPI en el líquido de perfusión en pacientes que desarrollaron episodios de rechazo en los primeros 6 meses post-trasplante. Se dividió la población a los 6 meses post-trasplante en pacientes que habían sufrido rechazos y los que no, y se analizaron los niveles de SLPI detectados en el líquido de perfusión del órgano que recibieron. Prueba de Mann Whitney. ***P ≤ 0.001; *P ≤ 0.05

Estos resultados sugieren que la medición de SLPI en el líquido de perfusión sería un buen marcador predictivo del desarrollo de DGF y de la evolución del injerto, al menos para el corto plazo.

3. PROTOCOLOS CLÍNICOS PARA LA PREVENCIÓN DEL DAÑO POR ISQUEMIA-REPERFUSIÓN.

Como mencionamos previamente, los pacientes trasplantados pueden sufrir un retraso en el funcionamiento del órgano, siendo esta una de las complicaciones más frecuentes en el post-trasplante. Teniendo en cuenta que esta falta de funcionalidad está directamente relacionada con el proceso de daño por isquemia reperfusión y siendo los ERO uno de los principales factores involucrados en la producción del daño, evaluamos la administración de un anti-oxidante (ácido alfa-lipoico, ALA) como una manera de reducir el efecto deletéreo de los mismos sobre el órgano y en última instancia en el resultado a corto plazo del trasplante. Para esta parte del proyecto, se implementaron tres protocolos

clínicos aprobados por el comité de ética de La Fundación Favaloro y del Hospital Italiano. En el primer protocolo exploratorio, se estudió el efecto del ALA en pacientes que fueron sometidos a trasplantes renopancreáticos. El 2do y 3er protocolo se evaluó el efecto de ALA en trasplantes hepáticos y renales, respectivamente.

3.1. USO DEL ALA EN PACIENTES TRASPLANTADOS RENOPANCREÁTICOS

En un principio se llevó a cabo un ensayo clínico exploratorio que involucró pacientes trasplantados renopancreáticos. Es importante mencionar que, en principio, se eligió a este grupo de pacientes para evaluar la seguridad del tratamiento debido a que el ALA está indicado en la neuropatía diabética y todos los pacientes trasplantados renopancreáticos incluidos en el estudio presentaban esta patología. Por lo tanto, la administración de ALA en estos pacientes estaba plenamente justificada.

Para este estudio se consideraron tres grupos: i) grupo control (C): fueron aquellos pacientes (n = 11) que no recibieron ALA previo o durante el procedimiento quirúrgico; ii) grupo de receptores tratados (grupo R): fueron aquellos pacientes (n = 8) a los que se les administró ALA una hora previa a la cirugía (la administración se realizó en la misma sala de cirugía); iii) grupo de receptores y donantes tratados (grupo DR): en este caso, se administró ALA a los receptores de la misma manera que en el grupo anterior, pero además recibieron un órgano proveniente de un donante cadavérico que había sido perfundido con ALA, 30 minutos previo al acto de ablación (n=7). De todos estos grupos, se obtuvieron plasma en diferentes momentos del acto quirúrgico para hacer las determinaciones bioquímicas, así como también se obtuvieron biopsias del grupo control y del grupo DR inmediatamente posterior a la reperfusión. Para evitar la injuria de los riñones, consideramos innecesario realizar biopsias en el grupo R, ya que era poco probable que se produjeran cambios en los niveles de transcripto entre el grupo control y el grupo R, teniendo en cuenta que las biopsias se tomaron inmediatamente luego del despinzamiento arterial.

3.1.1. Expresión de mediadores inflamatorios en biopsias de pacientes trasplantados.

Se realizó RT- qPCR para determinar la expresión de ARNm de mediadores inflamatorios involucrados en el daño por isquemia-reperfusión en las biopsias renales y pancreáticas del grupo C y DR. Particularmente se analizó los niveles de transcripto de C3, TNF-α, TGF-β, HMOX-1. En la Figura 14 se puede observar que las biopsias renales de los pacientes del grupo DR mostraron niveles menores de C3 y TNF-α y niveles mayores de TGF-β comparadas con las del grupo control. Por otra parte, la expresión de HMOX-1 no mostro diferencias significativas entre ambos grupos (p = 0,669).

Al analizar la expresión en páncreas, se pudo observar una alta expresión tanto de C3 (p= 0,0018) como de HMOX-1 (p<0,0001). A diferencia de lo observado en el tejido renal, donde se veían diferencias significativas en la expresión relativa de TNF-α y TGF-β entre ambos grupos de pacientes, en las biopsias pancreáticas no se observaron diferencias significativas en ninguno de los mediadores mencionados (Figura 14).

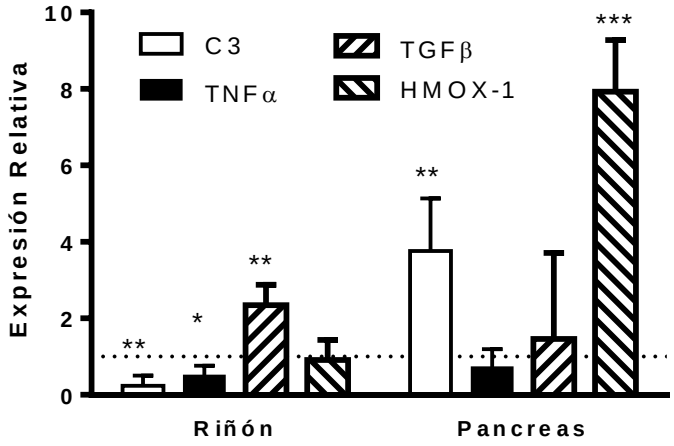


Figura 14: Expresión relativa en biopsias renales y pancreáticas de pacientes trasplantados renopancreáticos tratados con ALA. Se muestran el cambio de expresión (2^(- ΔΔCt)) en las biopsias del grupo de pacientes DR vs las biopsias controles. Los datos se representan como la media ± SD*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

3.1.2. Expresión de mediadores inflamatorios en plasma de pacientes trasplantados tratados o no con ALA.

A continuación, se midieron los niveles plasmáticos de las citoquinas IL-12p70, TNF-α, IL-8, IL-6 e IL-10 en el pre-trasplante y 12 h post-trasplante. En la Figura 15 se observa que luego de la cirugía, los pacientes que no fueron tratados con ALA (grupo control) presentaban niveles plasmáticos significativamente mayores de IL-8 ($p<0,05$), IL-6 ($p<0,001$) e IL-10 ($p< 0,0001$) con respecto a los valores presentes en la muestra pre-trasplante. En cambio, 12 horas posteriores a la cirugía, el grupo de pacientes tratados con ALA y que recibieron un órgano proveniente de un donante perfundido con ALA (grupo DR), presentaron niveles plasmáticos de IL-8 e IL-6 similares a los detectados en el pre-trasplante y, además, significativamente menores que los niveles detectados en el grupo control. Este efecto del ALA, sobre los niveles de IL-8, no se pudo observar en los pacientes del grupo R. En este mismo grupo de pacientes, los niveles de IL-10 e IL-6 mostraron una tendencia a ser menores a los del grupo control, pero estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (Figura 15). Con respecto a las citoquinas IL-12p70 y TNF-α, sus niveles plasmáticos estuvieron por debajo del umbral de detección del ensayo utilizado.

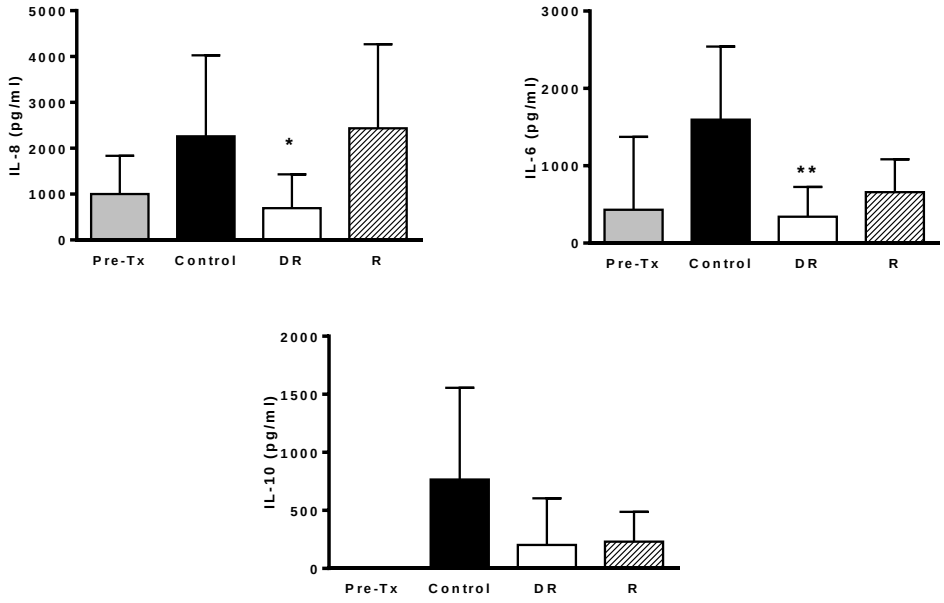


Figura 15: Niveles plasmáticos de citoquinas en pacientes trasplantados renopancreáticos medidos en muestras obtenidas en el pre-trasplante (Pre-Tx) y 12 h post-trasplante. Los pacientes del grupo DR, fueron tratados con ALA y recibieron un órgano proveniente de un donante cadavérico perfundido con ALA; en tanto los pacientes del grupo R, fueron tratados con ALA 1 hora previa al trasplante. Se representan los datos como la media ± SD. *p<0,05. ANOVA *pos hoc* Dunnett para comparaciones múltiples.

El acto quirúrgico representa un proceso traumático, provocando un aumento en las proteínas de fase aguda. Entre las proteínas de fase aguda, y para el caso de los trasplantes renopancreáticos, se destaca una proteína denominada Reg3/PAP, cuya expresión aumenta más de 200 veces durante la pancreatitis[208]. Por esta razón, decidimos determinar los niveles plasmáticos de esta proteína secretoria en el plasma de los pacientes tratados con ALA. En todos los grupos, el nivel plasmático de PAP medido al final de la cirugía (tiempo 0 h post-trasplante) se encontró aumentado en relación a los niveles encontrados en el pre-trasplante (Figura 16A). Sin embargo, a las 12 horas del trasplante, los niveles plasmáticos de PAP fueron significativamente menores, comparados con los niveles de las 0 horas, únicamente para los pacientes del grupo DR ($p=0,039$; Figura 16A), lo cual sugiere un menor grado de agresión en los pacientes tratados con ALA y que recibieron un órgano proveniente de un donante cadavérico perfundido con dicha droga.

Otra de las proteínas analizadas en el plasma de los pacientes trasplantados fue la alarmina SLPI. En la Figura 16B se puede observar un patrón de expresión similar al de PAP; es decir, únicamente los pacientes del grupo DR presentaron niveles de SLPI significativamente menores, a las 12 horas de la cirugía, comparado con los niveles hallados a las 0 horas (Figura 16B). Además, se pudo establecer una correlación directa entre los valores plasmáticos de SLPI y PAP (Figura 16C), sugiriendo que ambas proteínas, al ser proteínas de fase aguda, estarían indicando el grado de daño o insulto del organismo durante el trasplante.

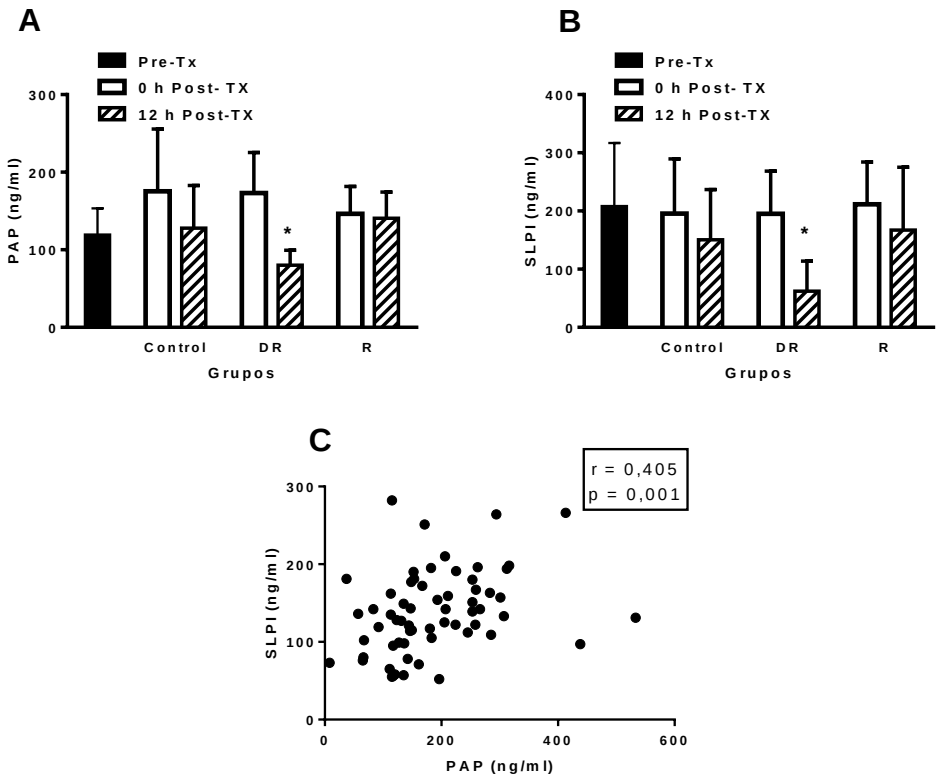


Figura 16: Niveles plasmáticos de PAP y SLPI en pacientes trasplantados renopancreáticos en el pre-trasplante, inmediatamente luego al acto quirúrgico (tiempo 0 h post-Tx) y 12 horas posterior al trasplante en el grupo C, R y DR. Los datos se representan como la media ± SD en (A) y (B). *p<0,05. Prueba de *t* pareada en comparación con el tiempo 0 h post-trasplante. (C) Correlación entre PAP y SLPI plasmáticos de todas las muestras analizadas. Coeficiente de correlación de Spearman.

Estos resultados nos indican que la perfusión de ALA a los donantes, tiene un efecto beneficioso, ya que transforma un injerto con alto potencial inductor de mediadores inflamatorios en órganos con menor potencial pro-inflamatorio.

3.1.3. Evaluación funcional de los órganos

Para determinar la importancia clínica del perfil inflamatorio observado en los grupos de pacientes tratados con ALA, examinamos parámetros bioquímicos vinculados a la función de los injertos pancreáticos (amilasa, lipasa y glucosa) y renales (creatinina y urea). El seguimiento se realizó en un período de tiempo de 14 días posterior a la cirugía. En la Figura 17A, se observa que los niveles plasmáticos de amilasa y lipasa, pero no de glucosa, creatinina o urea mostraron una tendencia a ser menores para el grupo DR en

comparación con los pacientes del grupo control, en el primer día post-trasplante. Sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas, probablemente debido a la alta variabilidad que presentan los valores plasmáticos dentro de cada grupo. Por esta razón, para reducir la variabilidad intragrupo, analizamos los valores de los parámetros bioquímicos durante los primeros 5 días post-trasplante, calculando el área bajo la curva para cada paciente y para cada parámetro analizado. La Figura 17B muestra que el grupo DR tenía niveles significativamente más bajos de amilasa y lipasa que el grupo control, mientras que el grupo receptor sólo mostró niveles ligeramente inferiores de lipasa comparados con los del grupo control, lo que confirma la tendencia encontrada en los valores del primer día. Con este análisis, también se observó que los pacientes del grupo DR mostraban una leve tendencia a tener los niveles de glucosa, creatinina y urea en plasma, menores que el grupo control. Sin embargo, cuando se realizó el mismo análisis, pero utilizando los valores de los parámetros clínicos obtenidos de las muestras de los días 6 a 14 post-trasplante, no se observaron diferencias significativas entre los grupos.

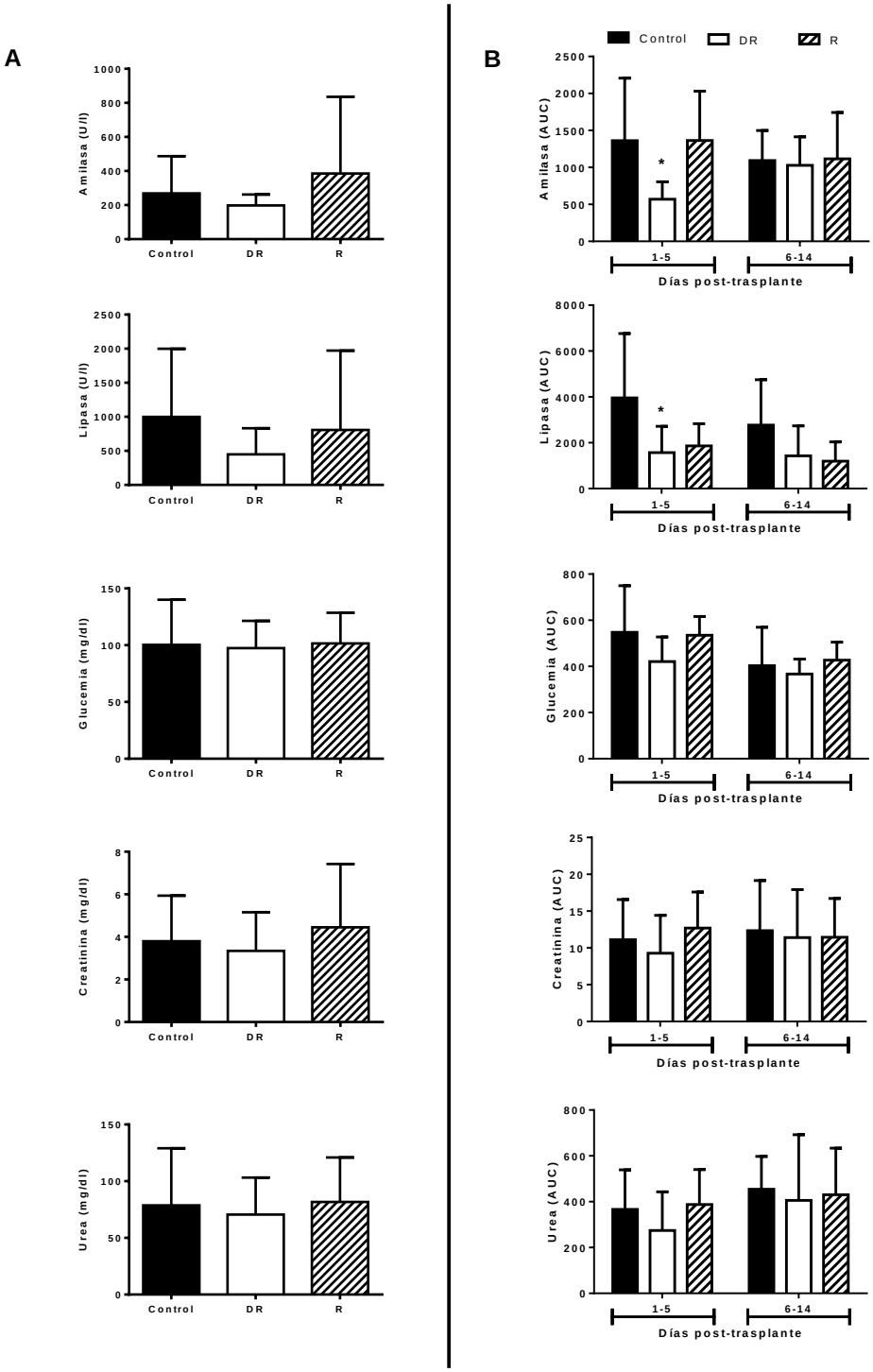


Figura 17: Niveles plasmáticos de amilasa, lipasa, glucosa, creatinina y urea. (A) Niveles del primer día post-trasplante. (B) Área bajo la curva de los primeros 5 días post-trasplante y del día 6 al 14. Los datos están representados como la media ± SD. *p<0,05. Prueba de Kruskal-Wallis con test post hoc Dunn.

3.1.4. Evolución clínica de los pacientes

La modificación observada en los parámetros génicos y bioquímicos no necesariamente implica una repercusión favorable en la clínica. Es por eso, que el siguiente paso fue estudiar la presencia de retraso de la función del injerto. En estos casos, se decidió evaluar el DGF examinando la presencia de disfunción renal y pancreatitis definiendo a la disfunción renal como una disminución menor al 70% de la creatinina basal a los 7 días post-trasplante y a la pancreatitis como un estado clínico de distención abdominal, dolor abdominal, hinchazón del injerto y necesidad de alimentación parenteral. Utilizando estos criterios se detectaron 3 pacientes con disfunción renal temprana en el grupo control. En cambio, sólo se detectó un paciente con disfunción renal dentro del grupo R y otro en el grupo DR. Cuando se evaluó la presencia de pancreatitis clínica, se diagnosticaron 3 casos de pancreatitis en el grupo de control, uno en el grupo DR y ninguno en el grupo R (Tabla 17). Luego, se realizó un seguimiento clínico a tres meses para evaluar parámetros clínicos más estrictos como son la sobrevida de los injertos y de los pacientes. A pesar que el número de pacientes reclutados y el tiempo transcurrido fueron muy bajos, se pudo observar que hubo una menor tasa de sobrevida del injerto y de los pacientes del grupo control en comparación con los grupos tratados (Tabla 17).

		CONTROL (n=11)	DR (n=7)	R (n=8)
Disfunción del órgano (%)	Disfunción renal	27,3 (n=3)	14,3 (n=1)	12,5 (n=1)
	Pancreatitis	27,3 (n=3)	14,3 (n=1)	0 (n = 0)
Tasa de sobrevida del injerto a 3 meses (%)	Riñón	91 (n=1)	100	100
	Páncreas	91 (n=1)	100	100
Tasa de supervivencia a los 3 meses (%)		91 (n = 1)	100	100

Tabla 17: Evaluación clínica de funcionamiento de los injertos a corto plazo y tasa de sobrevida de los injertos y los pacientes a los 3 meses post-trasplante. Se evalúa la disfunción renal como una disminución menor al 70% de la creatinina basal a los 7 días post-trasplante y a la pancreatitis como un estado clínico de distención abdominal, dolor abdominal, hinchazón del injerto y necesidad de alimentación parenteral.

Con estos resultados podemos determinar que el uso del ALA no afectó la función de los injertos, así como tampoco demostró ser un riesgo para la sobrevida del injerto y el paciente. Muy por el contrario, algunos parámetros bioquímicos y génicos indicaron que la administración de ALA podría tener algún efecto beneficioso para el injerto y para el paciente, al menos, a corto plazo.

3.2. USO DE ALA EN PACIENTES TRASPLANTADOS HEPÁTICOS

La falta de efectos tóxicos en los pacientes trasplantados renopancreáticos tratados con ALA sumado a los resultados promisorios obtenidos, nos permitió especular sobre la posibilidad de utilizarlo en otros tipos de trasplantes, como es el trasplante hepático, en donde el IRI tiene un impacto importante en la evolución del paciente. En estos casos, a diferencia del protocolo renopancreático, los pacientes fueron divididos de manera aleatoria sólo en dos grupos, una rama control (RC) y una rama de pacientes que recibieron injertos que fueron perfundidos con ALA y que además recibieron una dosis de

ALA por la vena porta inmediatamente previo al despinzamiento vascular (rama tratada, RT), evaluándose niveles de transcriptos, mediadores bioquímicos y signos clínicos.

3.2.1. Niveles de ARNm de mediadores en biopsias hepáticas

El efecto del tratamiento en la expresión de marcadores vinculados al estrés oxidativo y la inflamación fue estudiado realizando RT- qPCR en biopsias hepáticas. Estas fueron procesadas para el análisis de los siguientes transcriptos: Birc2, Sestrin2, IκBα, HIF-1α, IL-8, IL-6, mTOR, Reg3a/PAP, PHD1, PHD2, GATA3, CCR1 y SLPI. En la Figura 18 se observa que los niveles de los transcriptos de Birc2, Sestrin2, IκBα, HIF-1α, GATA3, CCR1, IL-6 e IL-8 son similares entre el grupo RC y RT. Por otro lado, se observa que existe un aumento en SLPI, aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa, en las biopsias de los hígados provenientes de los pacientes del grupo RT comparado con los del grupo RC. Sin embargo, los niveles de transcripto de PHD1 y 2 y REG3a/PAP fueron significativamente menores en el grupo RT comparado con los del grupo RC (Figura 18), indicando que la perfusión del órgano con ALA, protege al mismo de la hipoxia sufrida durante el procedimiento quirúrgico.

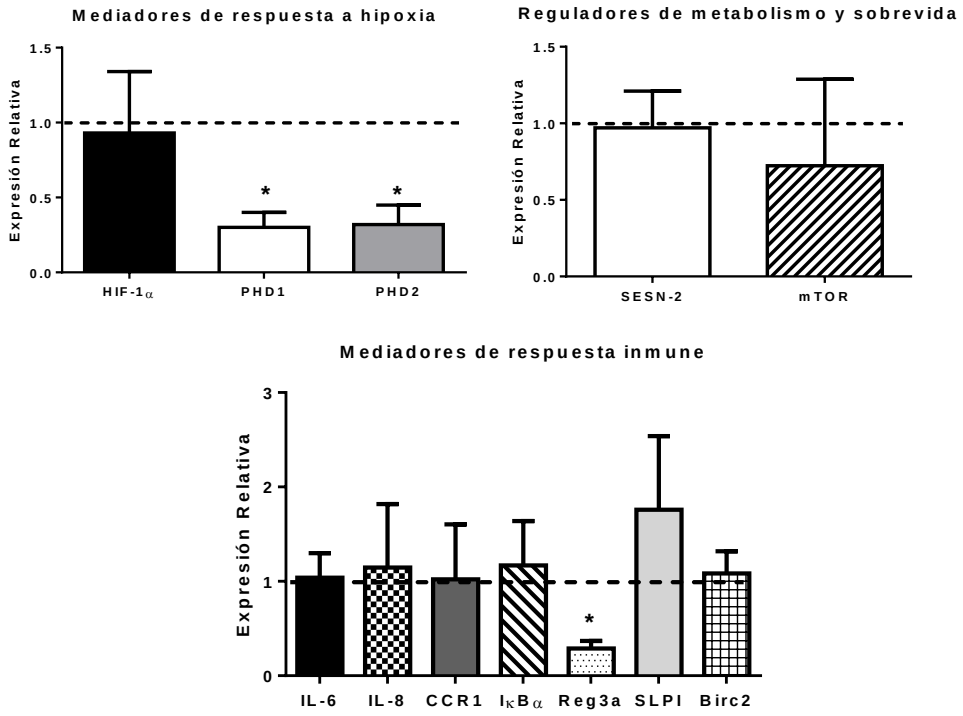


Figura 18: Expresión relativa en biopsias de pacientes trasplantados hepáticos. Se realizó RT- qPCR de biopsias de pacientes trasplantados hepáticos del grupo RC y RT**.** En el gráfico se muestra la expresión relativa de ARNm (2^(- ΔΔCt)) en las biopsias del grupo de pacientes RT vs las biopsias del grupo RC. Los datos se representan como la media ± SD*p<0,05. Prueba de Mann-Whitney.

3.2.2. Expresión de mediadores inflamatorios en plasma de pacientes trasplantados hepáticos tratados con ALA

En base a la menor expresión génica de REG3a/PAP en los pacientes trasplantados hepáticos del grupo RT, decidimos analizar los niveles plasmáticos de PAP en ambos grupos. Como se puede observar en la Figura 19, al igual que en las biopsias, los niveles plasmáticos de PAP en el grupo RC fueron mayores con respecto a los encontrados en el grupo RT, en la reperfusión y en el día 1 post-trasplante, siendo estadísticamente significativo únicamente en el 1er día post-trasplante.

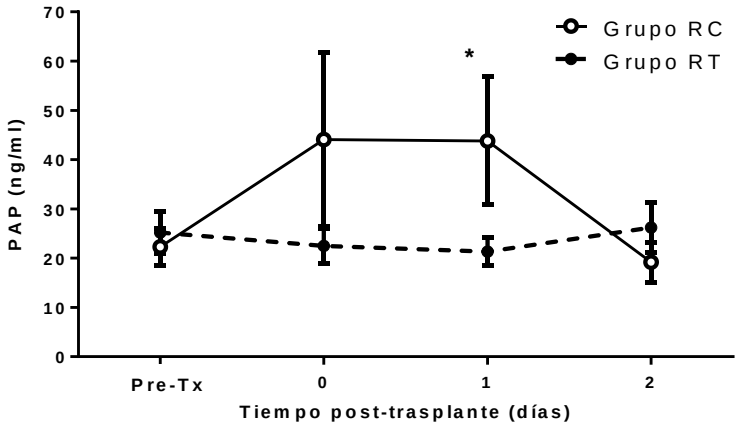


Figura 19: Niveles plasmáticos de PAP en pacientes trasplantados hepáticos en el pre-trasplante, durante la reperfusión (tiempo 0), al 1er y 2do día post-trasplante, en el grupo RC y RT. Se evaluaron los niveles de PAP en muestras tomadas a distintos tiempos post-trasplante, mediante un ELISA sándwich. Los datos se representan como la media ± SEM. P<0,05. Prueba de *t* no pareada.

Como se mencionó anteriormente, en los pacientes trasplantados renopancreáticos, los niveles de PAP se correlacionaban de manera directa con los valores de SLPI. Por lo tanto, en este caso también se analizaron los niveles plasmáticos de SLPI. En la Figura 20 se puede observar que en los pacientes del grupo RC, los niveles plasmáticos de SLPI se elevan a partir del momento del despinzamiento vascular y se mantienen elevados durante los dos primeros días post-trasplante. Este perfil, también se observa para el grupo de pacientes RT, pero el aumento es de mucha menor magnitud; de tal manera que al comparar los niveles plasmáticos de SLPI en el día 2 post-trasplante del grupo RT vs los del grupo RC, se observan valores significativamente menores. De esta manera, la tendencia observada en las biopsias (mayor nivel de SLPI), no se evidencia a nivel plasmático; muy por el contrario, se repite lo ya observado en pacientes trasplantados renopancreáticos en quienes se ven menores niveles de SLPI en el grupo tratado comparado con el grupo control.

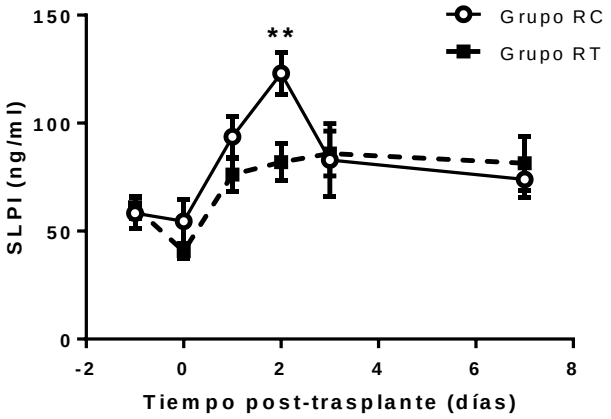


Figura 20: Niveles plasmáticos de SLPI en pacientes trasplantados hepáticos. Los pacientes trasplantados hepáticos reciben órganos perfundidos (Grupo RT) o no con ALA (Grupo RC). Se obtiene plasma previo al trasplante, durante la reperfusión y en los días 1, 2, 3 y 7 días post-trasplante y se realiza un ELISA sándwich. Prueba de *t* no pareada. P<0,01

3.2.3. Evolución clínica de los pacientes

Los pacientes trasplantados del grupo control y tratado fueron evaluados clínicamente, prestando especial atención en la presencia del síndrome de post-reperfusión (SPR). Como fue mencionado en la introducción, este síndrome es una amenaza latente relacionada con la incorporación del órgano recién injertado a la circulación del receptor. Dicho síndrome se manifiesta inmediatamente después del despinzamiento vascular y se acompaña de manifestaciones hemodinámicas, siendo la manifestación más prominente la caída brusca de la tensión arterial sistémica. También acontecen otras alteraciones químicas y físicas caracterizadas por hiperpotasemia, descenso del calcio sérico ionizado, hiperosmolaridad, acidemia metabólica e hipotermia.

El seguimiento post-trasplante mostró que 6 de los 23 pacientes (26%) presentaron SPR durante la cirugía. De los 6 pacientes que presentaron SPR sólo uno pertenecía al grupo tratado, en tanto que los 5 restantes pertenecían al grupo control (Figura 21). Uno de los pacientes del grupo control y que desarrolló SPR falleció durante la primera semana post-trasplante. La causa del óbito fue carcinomatosis peritoneal detectada durante la cirugía.

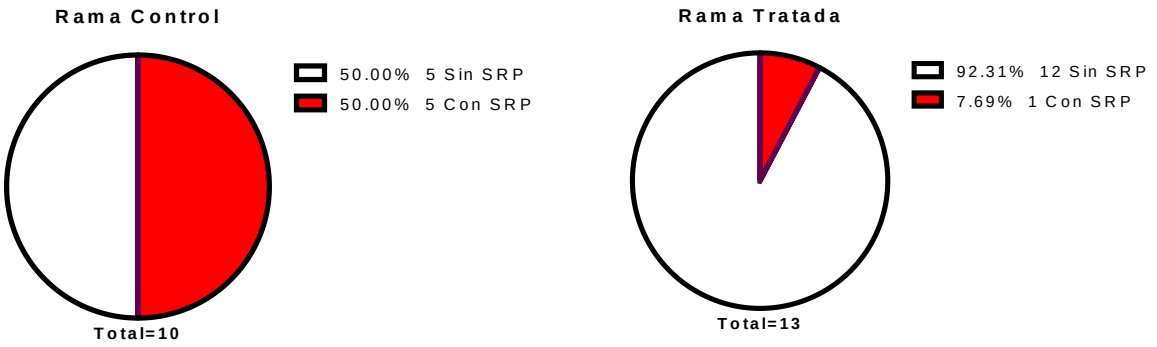


Figura 21: Porcentaje de pacientes de los grupos Rama Control y Rama Tratada que sufrieron o no SPR. Dicho síndrome se evalúa dentro del quirófano como hipotensión persistente (TA > 30% los valores de la fase anhepática), asistolia o arritmias que desencadenen inestabilidad hemodinámica, con necesidad de infusión continua de vasopresores. Aparición de fibrinólisis prolongada (más de 30 minutos) o recurrente (reaparición de fibrinólisis 30 minutos después de que haya sido resuelta).

En un seguimiento a más largo plazo (1er mes), se observó que 3 pacientes presentaron rechazo agudo, de los cuales 2 pertenecían al grupo RC y sólo uno al grupo RT. Todos estos pacientes habían presentado Síndrome de post-reperfusión. Estos resultados indican, al igual que en los trasplantes renopancreáticos, que la perfusión con ALA de los órganos a ser injertados, presenta un efecto beneficioso para la sobrevida del injerto y del paciente. Asimismo, en este protocolo tampoco se detectaron efectos adversos atribuibles a la infusión de ALA.

3.3. USO DEL ALA EN PACIENTES TRASPLANTADOS RENALES

En vistas de los buenos resultados obtenidos con ALA en los pacientes trasplantados renopancreáticos y hepáticos y teniendo en cuenta que el DGF es uno de los mayores problemas en trasplantes renales, se decidió iniciar otro protocolo clínico de uso de ALA en trasplante renal. Sin embargo, hubo que introducir variantes al protocolo de administración de ALA, dado que la administración del fármaco a los donantes cadavéricos resultaba dificultosa. Por lo tanto, para este protocolo se decidió administrar ALA al receptor (en el quirófano previo al procedimiento quirúrgico) y perfundir ALA al órgano una hora previa al trasplante.

En este estudio se reclutaron 22 pacientes, los cuales se dividieron en grupo control (n=8) y grupo tratado (n=14). De ambos grupos, se obtuvo plasma en diferentes momentos del acto quirúrgico para hacer las determinaciones bioquímicas, así como también se evaluó el estado clínico de los pacientes. En primer lugar, se realizó el análisis de los niveles de creatinina a lo largo de los días de internación de los pacientes y se obtuvo para cada uno de ellos, el área bajo la curva (AUC) de los niveles de creatinina. En la Figura 22, se observa que excepto por un paciente de la Rama Activa, el AUC de creatinina para estos pacientes fue similar al AUC de los pacientes de la Rama Control.

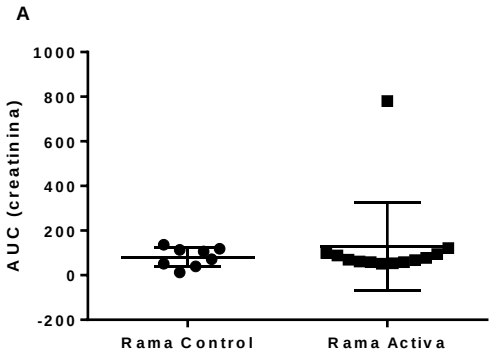


Figura 22: Área bajo la curva de los niveles plasmáticos de creatinina en pacientes tratados con ALA (Rama Activa) y pacientes sin tratamiento (Rama Control). Se grafica el AUC de creatinina calculada en función de los niveles adquiridos durante los primeros 14 días post-trasplante.

Tampoco se obtuvieron diferencias significativas en los valores de MDRD entre los pacientes de la Rama Control y los de la Rama Activa (dato no mostrado). Todos los pacientes requirieron sesiones de diálisis durante la primera semana de internación, por lo tanto, se considera que todos los pacientes sufrieron DGF. Sin embargo, cuando se analizaron los requerimientos de diálisis por día de internación, se pudo observar que los pacientes de la Rama Activa requirieron menos días de diálisis comparado con los de la Rama Control (p= 0,0024) (Figura 23).

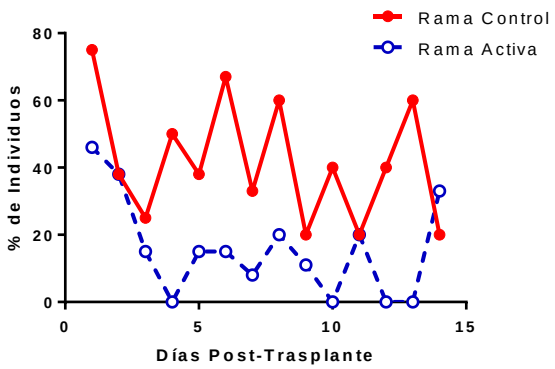


Figura 23: Requerimiento de diálisis en pacientes del grupo control y tratado. Se grafica el porcentaje de individuos que requirieron diálisis durante los primeros 14 días post-trasplante. Se realizó Prueba de rangos con signo de Wilcoxon para comparar el porcentaje de pacientes que se dializaron en ambos grupos a lo largo de dos semanas.

Por otro lado, 3 de los 8 pacientes de la Rama Control presentaron episodios de rechazo (mixto y humoral) verificados por biopsia renal en el transcurso de las dos primeras semanas. El rechazo se manifestó en uno de los pacientes en el día 5to, en tanto que en los otros dos pacientes el rechazo se manifestó en el 9no día post-trasplante. Sorprendentemente, ninguno de los pacientes tratados con ALA manifestó episodios de rechazo durante los primeros 14 días (Figura 24).

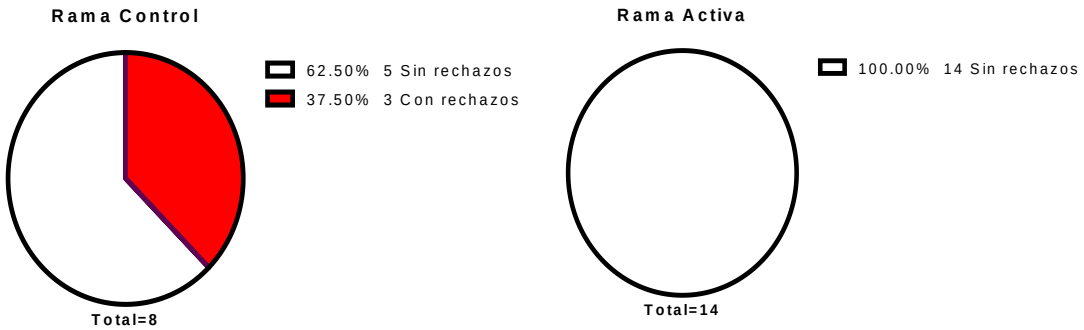


Figura 24: Porcentaje de pacientes de los grupos Rama Control y Rama Activa que sufrieron o no rechazos. Los rechazos fueron mixtos o humorales detectados mediante biopsias del órgano.

Todos estos resultados son extremadamente interesantes e importantes desde el punto de vista de la evolución de los pacientes, sugiriendo que el ALA podría ser una nueva herramienta terapéutica para evitar o reducir las complicaciones tempranas del trasplante de órganos sólidos y que además podría tener repercusiones positivas a largo plazo.

4. EFECTO DEL SLPI EN MODELOS DE DAÑO RENAL

Teniendo en cuenta la importancia clínica del daño por isquemia reperfusión en trasplante renal consideramos relevante buscar estrategias terapéuticas que pudieran mitigarlo. Como fue mencionado en la introducción, en este proceso de daño no sólo interviene la producción de intermediarios reactivos del oxígeno, sino también mediadores inflamatorios. Por lo tanto, se estudió la posibilidad de bloquear los fenómenos inflamatorios. En nuestro laboratorio disponíamos de una proteína recombinante humana, denominada SLPI con actividad antiinflamatoria, cicatrizante y microbicida. Cuya administración resulto efectiva en la reducción de lesiones causadas por fenómenos de autoinmunidad[209]. Además, otros autores demostraron que el SLPI fue eficaz en la disminución del daño en trasplante cardíaco y hepático. Por lo tanto, el siguiente paso fue evaluar la capacidad del SLPI de proteger del daño renal en un modelo de injuria por isquemia reperfusión. El mismo se llevó a cabo en ratas machos SPRague-Dawley a las cuales se les tomó una muestra de plasma pre-quirúrgica (tiempo 0). El procedimiento quirúrgico se realizó mediante laparotomía abdominal en la cual se generó la obstrucción del flujo sanguíneo renal por pinzamiento de la vasculatura. Luego de 40 minutos se permitió la reperfusión del órgano. Simultáneamente a un grupo de animales control (Sham) se los sometió al mismo protocolo sin efectuar maniobras de estasis sanguínea. A las veinticuatro horas posteriores al procedimiento se sacrificaron los animales mediante exanguinación y se obtuvieron muestras de tejido renal y plasma. El daño renal fue evaluado a través de la medición de BUN (nitrógeno ureico en sangre) y creatinina plasmática. En el grupo tratado con SLPI, el SLPI fue administrados en 3 dosis de 250 µg/kg, 24hs antes de la isquemia, al momento del procedimiento quirúrgico y 6 hs posteriores a la isquemia tal como se muestra en el esquema de la Figura 25.

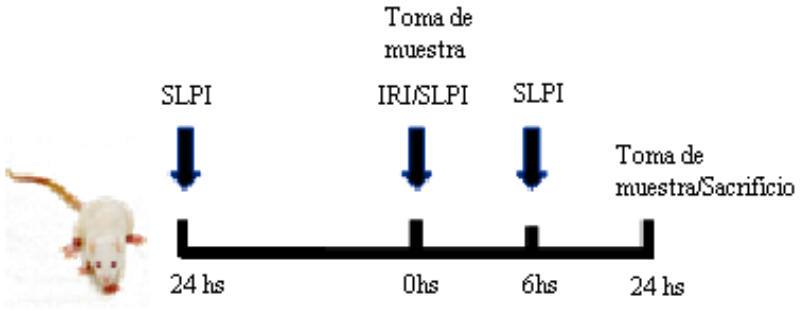


Figura 25: Esquema del modelo experimental. Los animales fueron tratados con SLPI 250 µg/kg (Grupo SLPI) o vehículo (Grupo IRI), 24 hs pre-isquemia, al momento de la isquemia (previamente se realiza la toma de muestra de sangre) y 6 hs post-isquemia. A las 24 hs se tomaron muestras de sangre y tejido renal.

Del análisis de los resultados pudimos determinar que el proceso de pinzamiento renal elevó los valores de creatinina (IRI: 3,74 ± 0,05 *vs* Sham: 0,84; 0,02 **p<0.01) y BUN (IRI 173,7 ± 10,11 *vs* Sham: 34,50 ± 4,500 ****p<0,0001), avalando el modelo de isquemia-reperfusión renal. Una vez puesto a punto, se procedió a evaluar el efecto del SLPI en este modelo. Como se puede ver en la Figura 26, el tratamiento con SLPI disminuyó significativamente los niveles de BUN y creatinina inducidos por la isquemia. Estos resultados permiten concluir que el SLPI reduce el daño renal causado por el proceso de isquemia-reperfusión.

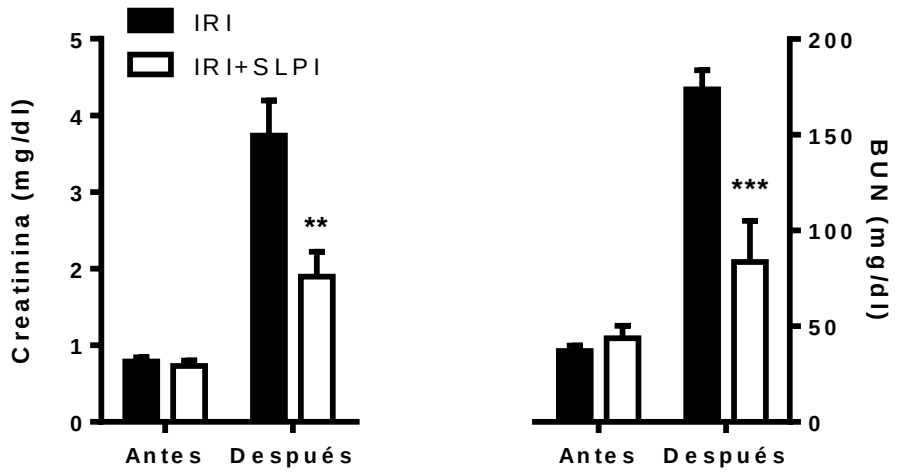


Figura 26: Medición de urea y creatinina en plasma. La determinación de la concentración de creatinina y BUN en plasma para cada grupo experimental, se realiza a partir de las muestras de sangre tomadas a tiempo 0 (antes de la realización de IRI) y a 24 hs post IRI. La administración de SLPI se realiza en 3 dosis tal como se describe en materiales y métodos. Los datos se expresan como media ± SEM. Prueba de *t* para datos no apareados **p < 0,01; ***p < 0,001

A su vez, se evaluó la histología de los riñones obtenidos. El análisis histológico mostró que los órganos con isquemia-reperfusión presentaban diferentes grados de lesión indicados por la presencia de pérdida de células sin sustitución, necrosis celular, dilatación tubular, edema intersticial, infiltración celular, células nucleadas en la vasa recta, y pérdida del borde en cepillo de los túbulos proximales. Estas características que corresponden al cuadro denominado necrosis tubular aguda (NTA), no se detectaron en ninguno de los animales Sham, por lo tanto, a estos animales se les asignó un valor de NTA de cero (datos no mostrados). En cambio, los animales sometidos a IRI mostraron un alto porcentaje de NTA (Figura 27), el cuál fue significativamente menor para aquellos animales que habían sido tratados con SLPI. Este resultado demostró que el SLPI tuvo un efecto protector al daño celular provocado por la isquemia-reperfusión.

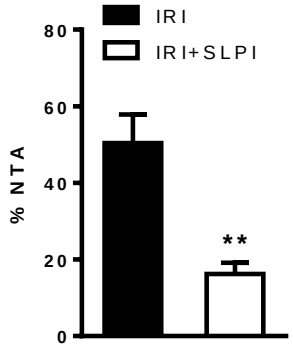


Figura 27: Porcentaje de Necrosis Tubular Aguda. Los cortes histológicos fueron examinados para determinar el grado de necrosis en células epiteliales tubulares. Las observaciones se realizaron en al menos 10 campos diferentes de 1μm^2 y la severidad de la necrosis es definida mediante el porcentaje de daño. Los datos se expresan como media ± DS del porcentaje de NTA. ***p<0,001. Prueba Mann Whitney.

En las muestras renales, además de la evaluación histológica también se analizaron niveles de transcriptos, particularmente de mediadores indicadores de la presencia de células presentadoras de antígeno profesionales (monocitos / macrófagos y células dendríticas). Mediante una RT- qPCR se estudiaron los niveles de CD86, CD68 y CD14. Se observó un aumento en la expresión de CD86, CD68 y CD14 en el grupo de animales que habían sufrido IRI comparado con el grupo Sham. A diferencia, los animales expuestos al fenómeno de IRI y tratados con SLPI, mostraron una menor expresión relativa de dichos transcriptos (Figura 28), sugiriendo que el tratamiento con SLPI reduce la cantidad de células presentadoras de antígenos profesionales reclutados por el daño.
Otros transcriptos analizados fueron CCL2 (MCP-1) y CXCL2 (MIP-2). La primera es una de las principales quimiocinas con actividad quimiotáctica para monocitos, en tanto que

CXCL2 lo es para leucocitos polimorfonucleares y células madre hematopoyeticas. El análisis de los niveles de estos transcriptos mostró que los animales que sufrieron IRI pero que habían sido tratados con SLPI (IRI+SLPI) presentaban una menor expresión relativa de CCL2, pero no así de CXCL2, en comparación con aquellos que no fueron tratados (IRI). Esto sugiere que la menor presencia de monocitos/macrófagos observada en el grupo tratado con SLPI se podría deber a una menor producción del principal factor quimiotáctico para estas células (Figura 28).

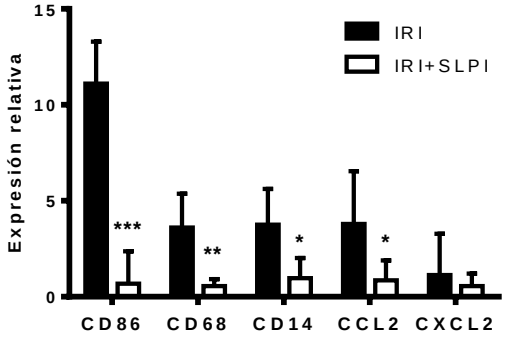


Figura 28: RT- qPCR de moléculas vinculadas al sistema monocítico/macrofágico. El tejido renal es procesado para extraer ARNm, el cual luego es retrotranscripto a ADNc. Posteriormente se amplifica por PCR. Los resultados se expresan como 2^-(ΔΔCt) normalizados a un gen control (GAPDH) y Grupo Sham. Los gráficos muestran la media ± SEM. Prueba Mann Whitney. *p<0,05; **p<0,01 *** p<0,001.

La causa del daño renal por IRI es compleja, pero se conoce que este daño es mediado en gran medida por componentes del sistema inmune; los cuales podrían ser inhibidos por SLPI. Por lo tanto, especulamos que el SLPI, no tendría efecto nefroprotector en otros modelos de daño renal, en particular aquellos modelos donde el sistema inmune no estuviera involucrado. Para evaluar esta hipótesis, utilizamos un modelo de nefrotoxicidad inducida por gentamicina en ratas. En este modelo, el fármaco se retiene en las células epiteliales de los túbulos proximales e induce la apoptosis y la necrosis de las mismas. En este caso, los animales se dividieron en cuatro grupos, un grupo recibió vehículo (No Tratado), otro SLPI (SLPI), y a los otros dos grupos se le administró gentamicina y gentamicina + SLPI. Todas las administraciones fueron intraperitoneales y la toma de muestra sanguínea se realizó al 5to día. Para nuestra sorpresa, los animales tratados con gentamicina + SLPI mostraron menores niveles de creatinina que las ratas tratadas con gentamicina sola (Figura 29). Este resultado no descarta un efecto nefroprotector del SLPI

actuando a través del sistema inmune, pero nos indica que el SLPI, además, tiene un efecto protector directo sobre el parénquima renal.

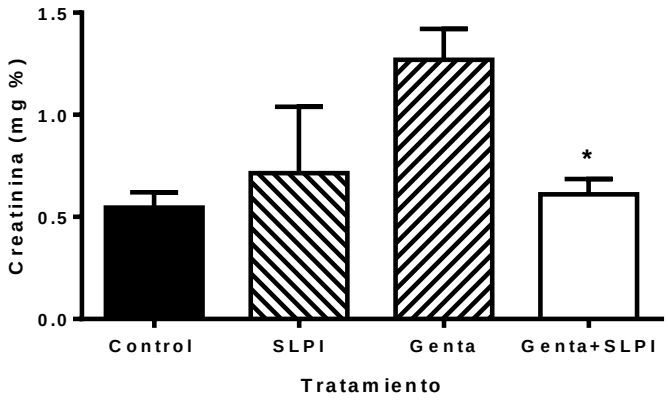


Figura 29: Niveles de creatinina plasmática en un modelo de daño renal por gentamicina. Los animales fueron tratados con Gentamicina (60mg/kg) o con Gentamicina(60mg/kg) + SLPI (250µg/kg) intraperitoneal, durante 4 días, al 5to día se toman muestras de plasma y se mide creatinina. * p < 0,05 Prueba de Mann Whitney

5. ROL DE SLPI EN PACIENTES TRASPLANTADOS RENALES

5.1. Determinación del SLPI en biopsias de pacientes trasplantados

Los resultados obtenidos hasta el momento, nos indicaban un claro efecto protector del SLPI en dos modelos diferentes de lesión renal. Estos resultados, de alguna manera se oponían a los descriptos por otros autores que mostraban que pacientes con lesión renal aguda presentaban niveles elevados de SLPI en sangre y orina. En esta sección de la tesis, se decidió profundizar sobre el papel del SLPI en la fisiopatología renal en seres humanos, utilizando como modelo de lesión, pacientes trasplantados renales. Con este objetivo se analizaron los niveles de transcripto de SLPI en biopsias renales, sus niveles plasmáticos y además se estudiaron posibles correlaciones con parámetros clínicos.

En primer lugar, en biopsias renales obtenidas al final de la cirugía de pacientes trasplantados, se evaluaron por RT- qPCR los niveles de ARNm de SLPI y de transcriptos que suelen asociarse con lesión (como C3 y TNF-α) o protección (como TGF-β y HMOX-1) de los tejidos. En la Tabla 18 se puede observar que existe una correlación directa entre los niveles del transcripto de SLPI y HMOX-1 o TGF-β pero no con C3 o TNF-α. Es

decir, que el SLPI presente en el injerto, estaría relacionado con genes vinculados a la citoprotección y mediadores antiinflamatorios. Para determinar si estos resultados tenían correlato clínico, se decidió evaluar la relación entre los niveles de transcripto de SLPI al momento de la biopsia y los niveles de creatininemia de los primeros 10 días post-trasplante, como marcador de la evolución funcional del órgano. De esta manera se pudo observar que los niveles de transcripto de SLPI se correlacionaban de manera indirecta con los valores de creatinina plasmática, en particular al día 10 post-trasplante, sugiriendo la existencia de una asociación entre los niveles de transcripto de SLPI local y la función renal a corto plazo.

		R	***p =***
HMOX-1		0,554	0,021
C3		0,430	0,085
TNFα		0,338	0,184
TGFβ		0,583	0,018
Creatinina plasmática	**Día 1**	-0,158	0,266
	Día 2	-0,215	0,196
	Día 3	-0,169	0,251
	Día 4	-0,179	0,239
	Día 5	-0,300	0,113
	Día 6	-0,362	0,077
	Día 7	-0,326	0,093
	Día 8	-0,333	0,089
	Día 9	-0,344	0,081
	Día 10	-0,485	0,024

Tabla 18: Correlación entre la expresión relativa de ARNm de SLPI en biopsias renales de pacientes (n=17) trasplantados *versus* mediadores inflamatorios y creatininemia post-trasplante. Se realizó RT-qPCR para la medición de transcriptos en biopsias tomadas al momento de finalizar el trasplante. Se miden los niveles de creatinina plasmática en los primeros diez días post-trasplante. Correlación de Spearman (dos colas).

5.2. Determinación del SLPI en plasma de pacientes trasplantados

A continuación, quisimos evaluar la presencia de asociaciones similares tomando en cuenta los niveles de SLPI plasmáticos, en lugar de los niveles locales del transcripto. Para lo cual, inicialmente se midieron los niveles de SLPI en un gran número de pacientes trasplantados renales, pacientes en lista de espera para trasplante renal (pre-trasplante) y personas sanas. Los pacientes trasplantados incluidos fueron todos aquellos pacientes que ingresaron al Instituto de Nefrología, Nephrology entre los días 21/11/13 y 5/12/13 como parte de su evaluación mensual de rutina. Por lo tanto, para esta parte del estudio, no se tuvieron en cuenta las características demográficas de los pacientes, el tiempo trascurrido post-trasplante y/o el tratamiento de inmunosupresión. Los resultados obtenidos mostraron que los niveles plasmáticos de SLPI, tanto en pacientes en pre-trasplante como en pacientes trasplantados, se encontraban significativamente elevados respecto a los niveles detectados en los individuos sanos. Sin embargo, los niveles de SLPI en los individuos trasplantados fueron menores comparados con los encontrados en los pacientes en lista de espera. (Figura 30)

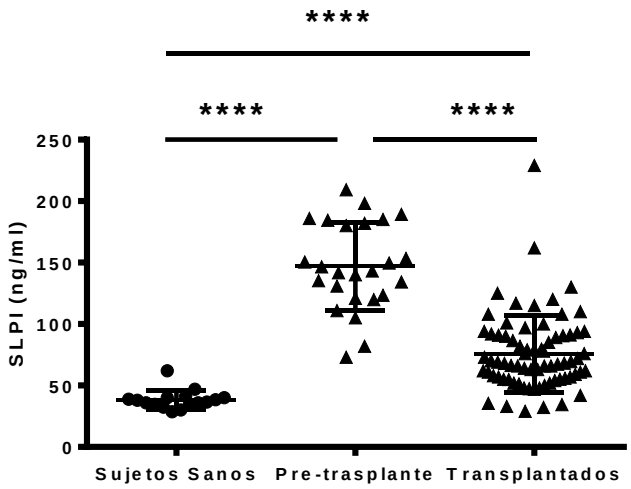


Figura 30: Niveles plasmáticos de SLPI en sujetos sanos (n=16), pacientes en lista de espera (Pre-trasplante) (n=25) y pacientes trasplantados (n=73). Se midieron los niveles de SLPI por ELISA sándwich. Prueba de Kruskal-Wallis con test post hoc Dunn. En el gráfico se muestra la Media±SD. ****p<0,0001.

Como fue mencionado previamente, estas mediciones se realizaron en diferentes pacientes en distintos momentos en relación al trasplante. Por lo tanto, para determinar si efectivamente existía una diferencia entre los niveles de SLPI en el pre-trasplante con respecto al post-trasplante, es decir si la intervención quirúrgica reducía los niveles, se

llevó a cabo una medición seriada de dicha proteína (en un mismo paciente), previo al trasplante y un día después. Como se muestra en la Figura 31, de nueve pacientes analizados, salvo en dos, los niveles plasmáticos de SLPI se reducen luego de la cirugía. Es probable que esta reducción, se deba a una mejora en la función renal, considerando que una parte del SLPI se metaboliza por riñón[210].

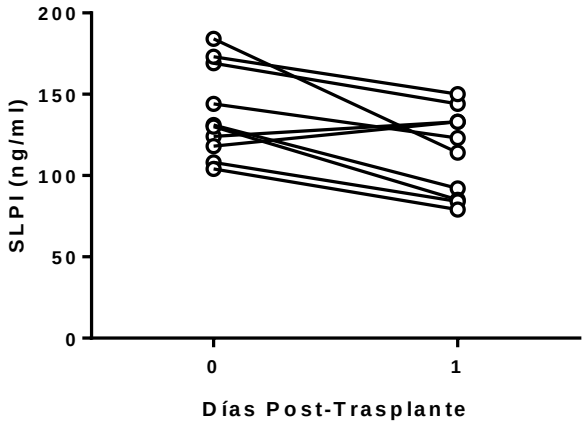


Figura 31: Niveles de SLPI plasmáticos en pacientes trasplantados renales. Se midieron los niveles plasmáticos de SLPI en muestras obtenidas previo a la cirugía (Día 0) y en el día posterior al trasplante (Día 1). Prueba de *t* para datos pareados (dos colas) p= 0,0108.

Una vez evaluados los niveles plasmáticos de SLPI, el siguiente paso fue establecer una posible asociación entre dicho parámetro y la función renal, estimada mediante los niveles de creatinina plasmática, en el total de los pacientes trasplantados. Para nuestra sorpresa y, a diferencia de lo observado con los transcriptos de SLPI (en biopsias renales) y la creatinina plasmática donde se veía una correlación indirecta (Tabla 18), en este caso se vio una correlación directa entre los niveles de SLPI plasmáticos con la creatininemia del paciente; ambos factores medidos en la misma muestra de plasma, es decir que los valores corresponden a un mismo día (Figura 32).

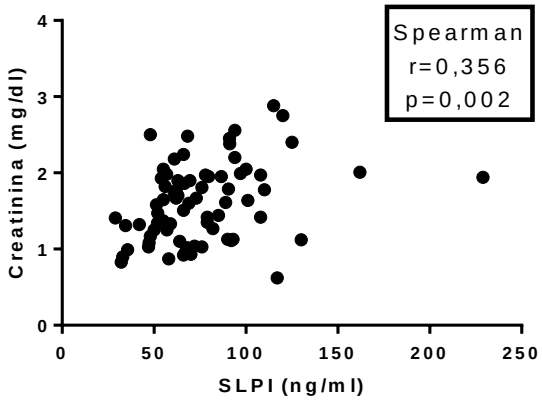


Figura 32: Correlación entre los niveles de SLPI y los niveles de creatinina plasmática en el total de los pacientes trasplantados renales. La determinación de SLPI y de creatinina plasmática, se realizan a partir de la misma muestra. Correlación de Spearman (dos colas)

5.3. Actividad funcional del SLPI en leucocitos derivados de pacientes trasplantados.

El resultado obtenido entre los niveles de SLPI y la creatininemia, nos hizo dudar sobre el rol protector que pudiera tener el SLPI plasmático en los pacientes trasplantados renales e inmunosuprimidos. Lo que llevó al cuestionamiento de la funcionalidad del SLPI en este tipo de individuos. De hecho, trabajos previos de nuestro laboratorio indicaban que, en determinados pacientes a diferencia de sujetos sanos, el SLPI no era funcional, al menos en lo que se refería a su capacidad para inhibir la proliferación leucocitaria y a la producción de IFNγ[211]. Por esta razón, el siguiente paso fue evaluar la posibilidad que los linfocitos de los pacientes trasplantados fueran refractarios a la acción del SLPI, tal como ya habíamos descripto en pacientes tuberculosos. Para lo cual se aisló CMSP (células mononucleares de sangre periférica) derivadas tanto de sujetos sanos como de pacientes trasplantados renales y fueron estimuladas *in vitro* con o sin el mitógeno PHA. Luego de 4 días de incubación, al cultivo se le agregó timidina tritiada y 16 horas más tarde las células fueron cosechadas, examinándose la proliferación celular por incorporación del radioactivo. En la Figura 33 se observa que, tanto los sujetos sanos como los pacientes trasplantados (inmunosuprimidos) respondieron al PHA, pero los niveles de proliferación leucocitaria fueron menores en estos últimos.

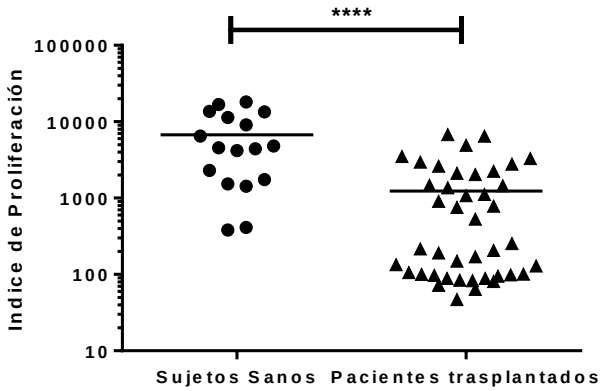


Figura 33: Índice de proliferación leucocitaria. CMSP fueron cultivados en presencia o ausencia de PHA; al 4to día se agregó timidina tritiada al cultivo celular y al 5to día se cosecharon las células. Los resultados se expresan como índice de proliferación, siendo el índice (c.p.m PHA/ c.p.m basal)*100. P< 0,0001 Mann Whitney test.

Por otra parte, dichas células también fueron cultivadas con PHA, en presencia o ausencia de SLPI. Cuando analizamos el índice de proliferación de las células incubadas en presencia de PHA y SLPI, pudimos observar que el SLPI provocó una clara y estadísticamente significativa disminución de la proliferación leucocitaria tanto en los sujetos sanos como en los pacientes trasplantados (Figura 34). A pesar de que la magnitud de la inhibición fue menor en los pacientes trasplantados comparada con los sujetos sanos, estos valores no fueron estadísticamente significativos (Sujetos Sanos = 42.2 ± 36.8 *vs* Pacientes trasplantados = 27.4 ± 25.2 % de inhibición; p = 0.091, Mann-Whitney test).

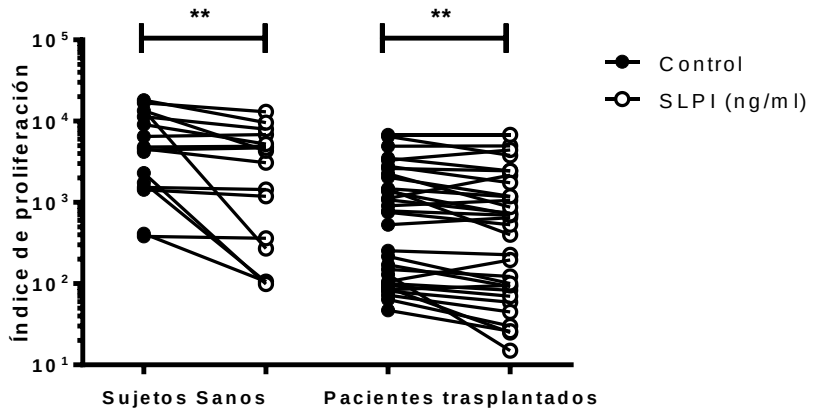


Figura 34: Índice de proliferación leucocitaria en presencia de PHA con o sin SLPI. CMSP de sujetos sanos y pacientes trasplantados fueron estimuladas *in vitro* con PHA en presencia (o) o no de SLPI (4 µg/ml) (●), al 4to día de cultivo se agregó timidina tritiada y se determinó la proliferación al 5to día. Prueba de rangos con signos de Wilcoxon (dos colas). ** p < 0,01.

Por último, analizamos si los niveles de proliferación leucocitaria en esta población de individuos se correlacionaban con los valores de SLPI plasmáticos. En la Figura 35, se puede observar que a mayor nivel plasmático de SLPI, existe una menor respuesta proliferativa de las CMSP frente al mitógeno PHA. El resultado nos permite concluir que aquellos pacientes que tienen niveles elevados de SLPI plasmáticos presentan menor índice de proliferación leucocitaria. Por lo tanto, podemos señalar que el SLPI tiene actividad funcional *in vitro,* así como también la tendría *in vivo*, en los pacientes trasplantados.

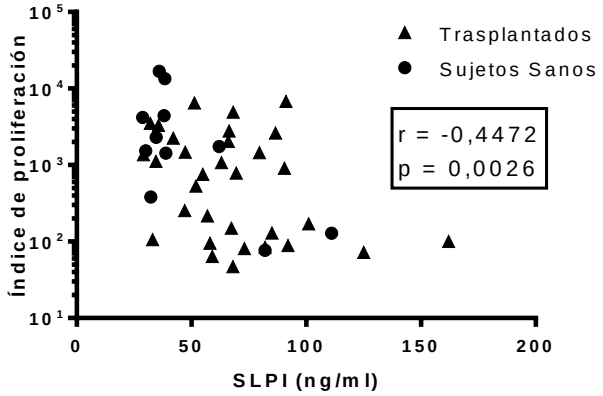


Figura 35: Correlación entre el índice de proliferación leucocitaria y niveles SLPI plasmáticos en sujetos sanos y pacientes trasplantados. CMSP de sujetos sanos (●) y pacientes trasplantados (▲) fueron estimuladas *in vitro* con PHA o no (basal), al 4to día de cultivo se agregó timidina tritiada y se determinó la proliferación al 5to día. Siendo el índice (c.p.m PHA/ c.p.m basal)*100. Los niveles de SLPI plasmático se determinan por ELISA sándwich. Coeficiente de correlación de Spearman (dos colas).

De esta forma, se pudo descartar la hipótesis de refractariedad de los leucocitos a la acción del SLPI, como causa de la asociación directa entre el SLPI plasmático y la creatininemia (Figura 32).

5.4. Actividad funcional del SLPI en células epiteliales renales

La correlación directa observada entre el SLPI y la creatinina plasmática podría estar indicando un efecto tóxico del SLPI sobre la viabilidad de las células epiteliales renales. Para evaluar esta posibilidad se llevó a cabo el siguiente experimento. Se incubó una línea de células epiteliales tubulares humanas (HK-2) con SLPI y se analizó la citotoxicidad mediante dos tipos de ensayos. El ensayo de MTT y el ensayo de marcación

de anexina V / yoduro de propidio. Con el primer ensayo se evaluó la actividad metabólica celular, en tanto que con la anexina V/ yoduro de propidio se determinó la apoptosis temprana, tardía y la necrosis.

Para el primer ensayo, las células fueron tratadas con diferentes concentraciones de SLPI, pero también se utilizó como control positivo de citotoxicidad una droga inmunosupresora denominada tarcolimus o FK-506. Asimismo, incubamos FK-506 con SLPI. Los resultados del ensayo de MTT, mostraron que la incubación de las células HK-2 con 4 y 0,4 μg/ml de SLPI durante 24 hs no indujo citotoxicidad (dato no mostrado). Por el contrario, el tratamiento por 24hs con el inhibidor de calcineurina FK-506 (10 μM) provocó la muerte de un número significativo de células (p= 0,0286). Sin embargo, cuando las células HK-2 fueron tratadas con ambos factores, SLPI y FK-506, la viabilidad de las células epiteliales tubulares humanas fue significativamente mayor que las células tratadas sólo con FK506 (Figura 36). Estos resultados fueron inesperados y estaban sugiriendo un efecto nefroprotector del SLPI sobre las células tubulares epiteliales renales humanas.

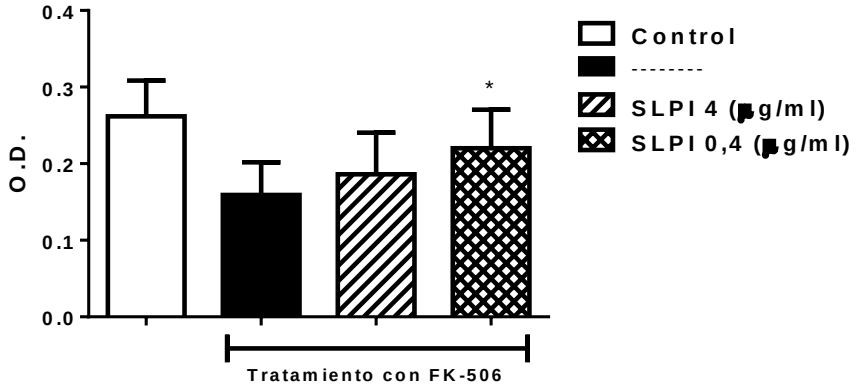


Figura 36: Ensayo de MTT para evaluación de la muerte de células HK-2 tratadas con FK506 y SLPI. Se cultivaron células HK-2 sin tratamiento, con tratamiento FK506 (10 μM), FK506 (10 μM) + SLPI 4 μg/ml o 0,4 μg/ml durante 24 hs a 37°. Posteriormente se midió la absorbancia utilizando un lector de ELISA. Se muestra la media ± SD. n=4. *p<0,05; Test de Mann Whitney.

Para confirmar este resultado, se evaluó la muerte celular mediante el ensayo de marcación con anexina V / yoduro de propidio. En estos experimentos, además del tratamiento de las células HK con FK-506, también se utilizó como control positivo del ensayo a las células deprivadas de suero (Figura 37). Las Figuras 37A y C muestran que ambos estímulos citotóxicos inducen la apoptosis de más del 90% de las células,

considerando la apoptosis temprana y tardía. Sin embargo, la presencia de SLPI (0,4 µg/ml) redujo la apoptosis a 57,3 y 56,7% para la privación sérica y la toxicidad por FK506, respectivamente (Figura 37B y 37D).

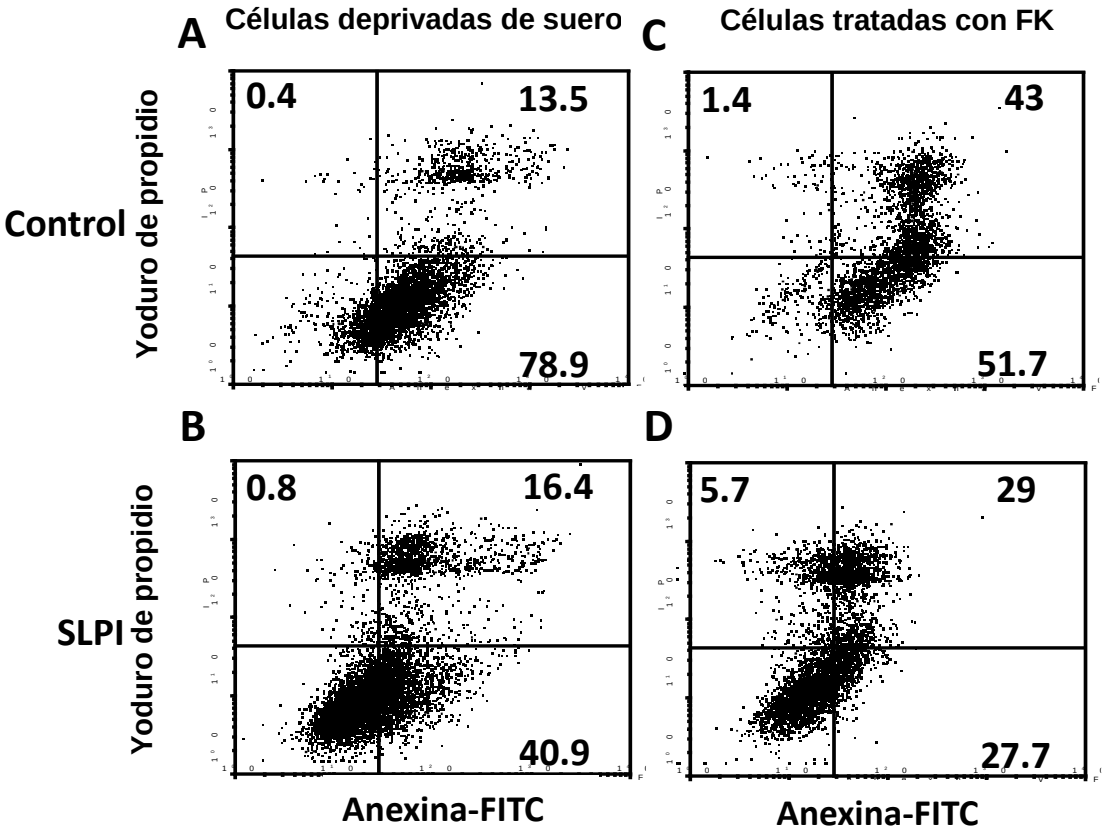


Figura 37: Citometría de flujo de células HK-2 marcadas con Anexina V/ Yoduro de propidio. Las células fueron sembradas y sincronizadas. Al día siguiente se colocaron los estímulos: sin suero, sin suero + SLPI, con FK506, FK506 + SLPI. Luego de 24hs a 37°C las células se levantaron con tripsina, se marcaron y pasaron por un citómetro de flujo. Se muestra un experimento representativo de n=4.

Teniendo en cuenta la relevancia clínica de los resultados obtenidos con el SLPI, en particular en lo que se refiere a su efecto nefroprotector, el siguiente paso fue examinar los mecanismos por los cuales el SLPI ejerce dicho efecto. Para ello las células epiteliales tubulares humanas (HK-2) fueron incubadas con FK506 (10µM) en presencia o ausencia de SLPI (0,4µg/ml) y analizamos la expresión de ARNm a través de un microarreglo enfocado en vías de toxicidad, estrés y muerte celular (SABiosciences).

Como era de esperar, las células HK-2 tratadas con FK506 presentaron un aumento de niveles de transcriptos relacionados con muerte celular (BECN1), hipoxia (BNIP3L), estrés osmótico (SLC5A3) y respuesta inflamatoria (CCL2). Por el contrario, el co-tratamiento

con SLPI disminuyó los niveles de ARNm inducidos por FK506 y notablemente aumentó los niveles de ARNm de proteínas de choque térmico (ATF4, ATF6, HSP90AA1) y TLR4 (Figura 38). Estas observaciones confirman el papel protector de SLPI en la muerte celular y sugieren que la protección SLPI podría ser mediada por el aumento de expresión de proteínas de choque térmico, que funcionan como chaperones moleculares, y la disminución de quimiocinas inflamatorias.

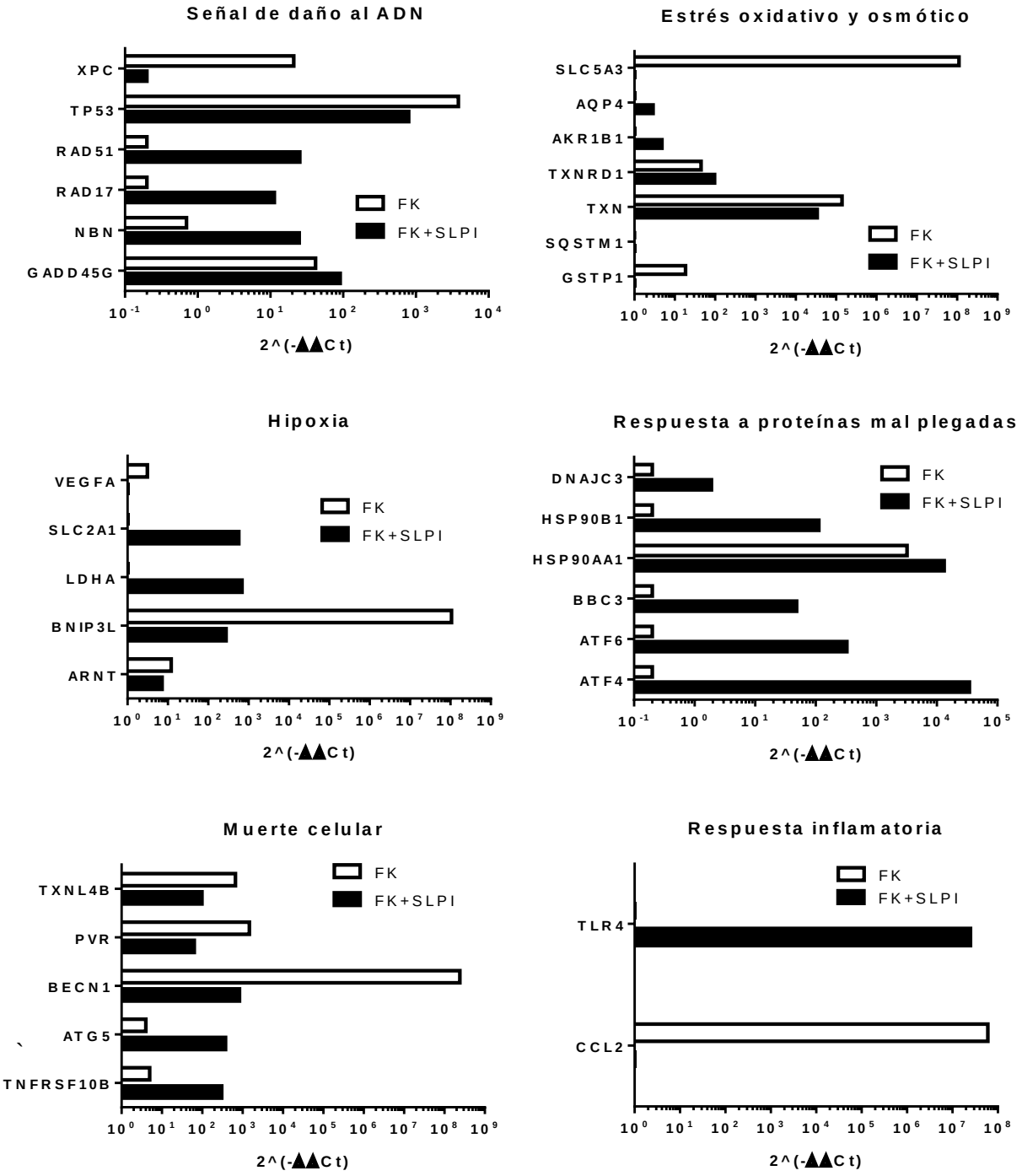


Figura 38: RT- qPCR de mediadores vinculados al estrés, toxicidad y muerte celular. Células HK-2 fueron sembradas y sincronizadas, a las 24 hs se agregó el tratamiento: FK506 (10µM) y FK506+SLPI (0,4µg/ml). Se dejó el tratamiento por 24hs y se aisló ARNm, una vez retro-transcripto a ADNc se realizó el microarreglo.

5.5. Factores inductores de SLPI en pacientes trasplantados

Hasta aquí, podemos concluir que los pacientes trasplantados renales tienen niveles plasmáticos altos de SLPI, el cual podría tener un efecto protector sobre el parénquima renal. Sin embargo, desconocíamos las razones por las cuales el SLPI en estos pacientes se encontraba elevado. Al respecto hipotetizamos que, los niveles elevados podrían deberse a la presencia de estímulos inductores de SLPI. Conociendo que uno de los estímulos más relevantes para la producción de SLPI es la presencia de daño, decidimos estudiar la producción de esta proteína en CMSP derivadas de individuos sanos y de pacientes trasplantados en respuesta células apoptóticas. En este caso, utilizamos células HK-2 apoptóticas como estímulo, y monocitos derivados de sujetos sanos y pacientes como células respondedoras a las señales de daño (en relación 1:3). Luego de 48 horas de co-incubación, se cosechó el sobrenadante y se midieron los niveles de SLPI. Como se puede observar en la Figura 39 monocitos de pacientes trasplantados son capaces de producir niveles basales de SLPI, sin embargo, cuando se realiza el co-cultivo con células apoptóticas los niveles de SLPI son significativamente mayores. A su vez, los monocitos de sujetos sanos también responden frente a este estímulo no obstante la diferencia con el control no es significativa. Es importante destacar que los niveles de SLPI fueron indetectables tanto para las células HK-2 apoptóticas solas como en la incubación de monocitos con células HK-2 vivas (dato no mostrado).

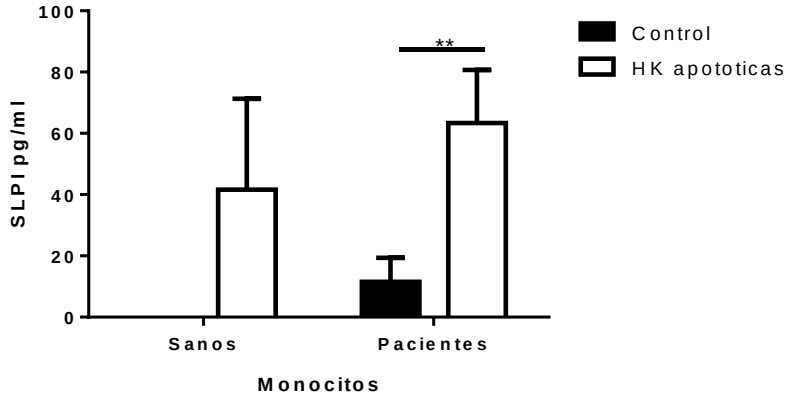


Figura 39: Niveles de SLPI en sobrenadante de monocitos de sujetos sanos(n=2) y pacientes trasplantados(n=6) estimulados con células apoptóticas HK-2. Los monocitos fueron aislados a partir de CMSP utilizando perlas magnéticas acopladas a anticuerpos anti CD14. Dichas células fueron cultivadas junto con células HK-2 apoptóticas (deprivadas de suero por 48 hs) durante 48 hs. Posteriormente se recupera el sobrenadante y se miden los niveles de SLPI por ELISA. ANOVA de una vía con Test LSD de Fisher para comparaciones múltiples.

Además del nivel de daño tisular, podrían existir otras variables que influyeran sobre los niveles de SLPI. Para analizar este aspecto, estudiamos los niveles plasmáticos de SLPI en relación a diferentes parámetros del paciente trasplantado como ser el sexo, la edad, el tiempo en diálisis, el tiempo transcurrido desde el trasplante, los valores absolutos y relativos de linfocitos, neutrófilos, monocitos, basófilos, hematocrito, el número de plaquetas y la concentración de hemoglobina. Como resultado pudimos determinar que, los valores de SLPI no fueron diferentes según el sexo del receptor (68,78±24,51 vs 80,97±34,82 p=0,147 Mann Whitney test). En ninguno de los parámetros analizados se encontraron correlaciones significativas, excepto en dos: el tiempo post-trasplante (Figura 40) y el número de leucocitos (Tabla 19). En ambos casos, la correlación fue indirecta.

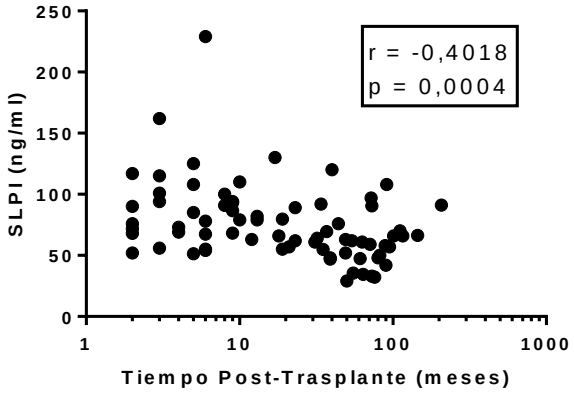


Figura 40: Niveles de SLPI plasmáticos en función del tiempo post trasplante. Se midieron los niveles de SLPI en pacientes trasplantados renales mediante ELISA sándwich. Correlación de Spearman (dos colas).

	r=	p=	
EDAD (RECEPTOR)	0,121	0,347	Ns
MESES POST-TRASPLANTE	-0,402	0,0004	***
HEMOGLOBINA	0,418	0,096	Ns
LEUCOCITOS (cel/µl)	-0,397	0,011	*
NEUTRÓFILOS(%)	0,116	0,477	Ns
LINFOCITOS(%)	-0,121	0,457	Ns
MONOCITOS(%)	-0,201	0,232	Ns
EOSINÓFILOS(%)	-0,066	0,476	Ns
BASÓFILOS(%)	0,208	0,408	Ns
PLAQUETAS	0,112	0,659	Ns
NEUTRÓFILOS (valores abs)	-0,192	0,236	Ns
LINFOCITOS(valores abs)	-0,298	0,062	Ns
MONOCITOS(valores abs)	-0,289	0,070	Ns
EOSINÓFILOS(valores abs)	-0,008	0,972	Ns
BASÓFILOS(valores abs)	0,404	0,108	Ns

Tabla 19: Correlación entre niveles de SLPI plasmáticos y características del paciente trasplantado. Correlación de Spearman (dos colas)

5.6. El SLPI plasmático como biomarcador de daño o protección

Dado al conjunto de resultados obtenidos hasta el momento, quisimos evaluar la posibilidad de utilizar al SLPI plasmático como biomarcador de daño o protección del parénquima renal. En virtud de las diferentes variables que pueden llegar a influir sobre los niveles de SLPI plasmático (metabolización renal, meses post-trasplante, leucocitos, daño inmunológico, nefrotoxicidad, muerte celular) decidimos volver a analizar el gráfico SLPI plasmático vs creatininemia, pero en esta oportunidad trazamos líneas correspondientes a rangos de normalidad para SLPI (55-91 ng/ml según percentilo 25 y 75) y para creatinina (0.6-1.2 %) (Figura 41). Con este gráfico se pudo volver a apreciar la existencia de una correlación directa entre SLPI y creatinina pero, además, se puso en evidencia la presencia de pacientes cuyos valores de SLPI no se correspondían a los valores de creatinina (SLPI alto con creatinina normal o bajo y SLPI bajo con creatinina alta).

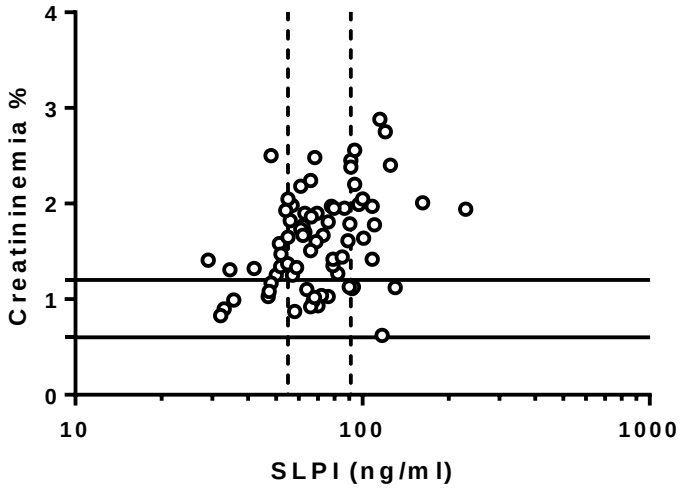


Figura 41: Correlación entre los niveles de SLPI y los niveles de creatinina plasmática en el total de los pacientes trasplantados renales. La determinación de SLPI y de creatinina plasmática, se realizan a partir de la misma muestra. Se divide el gráfico en cuatro cuadrantes, la división se realiza utilizando como valor límite normal de creatinina de 0,6 a 1,2 mg/dl y de SLPI de 55 a 91,2 ng/ml. Este rango de SLPI se toma según percentilo 25 y 75).

Para poner en evidencia a los pacientes cuyos valores de SLPI no se correspondían con los valores estimados de creatinina (dicho de otra manera, a la función renal), creamos un cociente SLPI/creatinina cuyo valor de mediana fue de 43,1 con un intervalo de confianza de 95% de 38,73 y 48,74 y un coeficiente de variación del 50.6 %. Sin embargo, como se observa en la Figura 42, varios pacientes presentaron valores por fuera del percentilo 10 (28.3) y del percentilo 90 (78.2), sugiriendo que en algunos pacientes los valores de SLPI son superiores o inferiores al valor esperado según su función renal. Estos valores superiores o inferiores de SLPI podrían deberse a la presencia de estímulos inductores (por ejemplo, células apoptóticas, DAMPs) o inhibidores (IFNγ), respectivamente[38, 212].

De hecho, se observa que la mayoría de los pacientes que están por fuera del percentilo 10 y 90 presentaron dentro de los seis primeros meses posteriores a la determinación de SLPI un episodio de rechazo humoral o mixto. En tanto otros, presentaron alguna otra complicación (infecciones por BK, hipertensión arterial, síndrome metabólico, trombofilia).

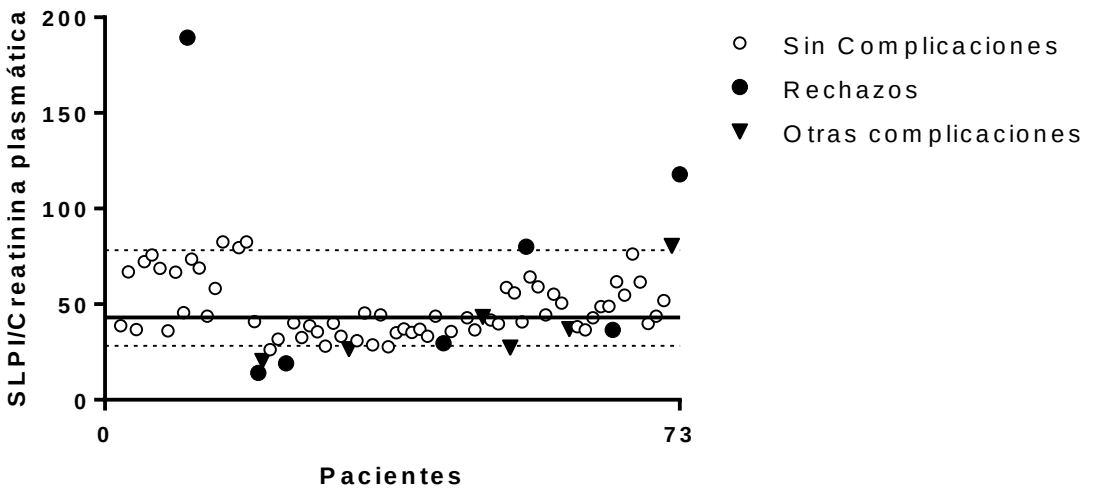


Figura 42: Índice SLPI/creatinina. Se grafica el índice SLPI y creatinina sérica para cada paciente incluido en el estudio graficándose la mediana y los percentilos 90 y 10 (78,2 y 28,3, respectivamente). Del total de pacientes (73), sólo se pudo hacer un seguimiento a los 6 meses de 49 pacientes, identificándose 7 pacientes con episodios de rechazos humoral o mixto (círculo negro). Otros 6 pacientes presentaron complicaciones como infecciones, síndrome metabólico, trombofilia, hipertensión arterial (triángulo negro). El resto de los pacientes no presentaron complicaciones (círculo blanco).

Discusión

El trasplante de órganos sólidos vascularizados ha sido uno de los avances más destacados de la medicina en el último siglo. Sin embargo, en la actualidad la problemática de la disparidad entre el número de trasplantes realizados y los pacientes en lista de espera es alarmante. Por esa razón la comunidad médica recurrió al uso de donantes de criterio expandido y gracias a su implementación se logró aumentar el número de órganos disponibles a trasplantar. Sin embargo, también aumentó el riesgo de retraso de la función del injerto. En estos casos, el uso de biopsias pre-trasplante permitiría determinar el estado del órgano, no obstante los factores de riesgo asociados al donante no son los únicos que influyen en el resultado post-trasplante, dado que también son importantes aquellos asociados al receptor[207]. En esta tesis estudiamos algunos de estos factores, vinculándolos a la expresión de mediadores inflamatorios y a la posibilidad de utilizar a estos últimos como biomarcadores predictores de la función renal. Asimismo, exploramos la intervención terapéutica antioxidante con el objetivo de reducir las complicaciones tempranas presentes en los trasplantes de órganos sólidos vascularizados.

1. Expresión de marcadores inflamatorios en pacientes trasplantados con o sin DGF.

La relación entre IRI y DGF se sustenta en la presencia de un complejo proceso inflamatorio. El análisis del microarreglo realizado en biopsias de pacientes con y sin DGF mostró que varios mediadores inflamatorios se encuentran aumentados en pacientes con DGF. Los genes que mostraron una mayor diferencia en los niveles de transcriptos entre pacientes con DGF y sin DGF fueron TGF- β, IL-R1, IL-10, IFNA1, IL-1F7 y HMOX-1. Sin embargo, se pudo corroborar esa diferencia por RT- qPCR, en un número mayor de pacientes sólo para TGF- β, IFNA1, IL-1R1, y HMOX-1. Ciertamente los fármacos inmunosupresores pueden afectar la expresión de genes, por esta razón es importante mencionar que, en este estudio, el perfil diferencial de transcriptos observado no se debió a diferencias en la inmunosupresión, ya que todos los pacientes incluidos tuvieron el mismo tratamiento inmunosupresor.

Un aspecto a destacar de esta primera parte del trabajo, fue que no todos los mediadores inflamatorios se ven alterados con DGF ni, en aquellos que encontramos una expresión

diferencial, se vinculan de la misma forma con los factores de riesgo. Basados en la actividad de los mediadores IFNA1 e IL-1R1, podemos especular que el patrón de citoquinas aumentadas en DGF es compatible con un estado proinflamatorio. Por ejemplo, IFNA1 tiene una acción antiviral bien conocida y también juega un papel importante en la respuesta inmune adaptativa actuando sobre las células dendríticas, las células NK y los linfocitos[213, 214]. Además, IL-1R1 es un receptor de señalización para IL-1, la cual es una citoquina con funciones pleiotrópicas, estimulando la angiogénesis en sitios de inflamación, desencadenando la expresión de otras citoquinas proinflamatorias y contribuyendo a la polarización de células Th17 [215]. La regulación positiva de IL-1R1 observada en biopsias de pacientes con DGF sugiere que estos riñones podrían ser más susceptibles a la IL-1, presente en microambientes proinflamatorios. De acuerdo con este microambiente proinflamatorio, encontramos que los niveles del transcripto de TGF-β, citoquina antiinflamatoria, son menores en los pacientes con DGF[216]. Su efecto inmunosupresor es bien conocido dada la inhibición de la activación de los linfocitos, pero también se ha descripto una actividad proinflamatoria[216, 217]. A su vez y en concordancia con nuestros resultados, se ha descripto que pacientes con genotipo de baja producción de TGF-β poseían un deterioro significativo de la función de injerto a cuatro años post-trasplante[218]. A diferencia, los niveles de transcripto de HMOX-1, enzima importante que degrada el grupo hemo en monóxido de carbono, biliverdina y hierro libre, se encuentran aumentados en pacientes con DGF. La expresión de HMOX-1 es inducible en respuesta a estrés y tiene actividad antioxidante, antiinflamatoria y antiapoptótica [219, 220]. De hecho, la expresión de HMOX-1 protege del rechazo crónico[221]. El aumento de la expresión de HMOX-1, tanto por transferencia de genes o por inducción farmacológica, confiere una protección significativa contra la lesión isquémica renal[222]. Es probable que la mayor expresión de HMOX-1 en pacientes con DGF se deba al microambiente proinflamatorio detectado en las biopsias y, por mecanismos de retroalimentación, tienden a controlar el estado proinflamatorio.

Los hallazgos en las biopsias tomadas a los siete días, son los resultantes de los diferentes factores aportados por el donante (como la edad, el IMC y la creatinina de preablación), el período de procuración e implante (TIF, tiempo de isquemia caliente y tipo de líquido de preservación) y el receptor (edad, IMC). De hecho, hay muchos más factores que influyen en el DGF, como la terapia de inmunosupresión[223]. Sin embargo, al analizar las correlaciones entre los mediadores descriptos y cada uno de los factores que contribuyen al DGF, se determinó la fuerza relativa de cada factor en el proceso

inflamatorio. De los factores derivados del donante que fueron analizados, la edad del donante y la creatinina de preablación se correlacionaron negativamente con TGF-β, siendo la creatinina preablación un factor que refleja el estado del riñón a injertar. En este caso, nuestro trabajo indica que mientras mayor es el nivel de creatinina en el donante, probablemente mayor es el daño del riñón y por lo tanto el nivel de transcripto de la citoquina antiinflamatoria será menor, una vez implantado en el receptor. En realidad, al mencionar un mayor daño renal, lo que estamos especulando es sobre la mayor capacidad inflamógena de un riñón con niveles de creatinina pre-ablación altos; probablemente por una mayor carga de DAMPs. De esta forma parecería que los factores del donante influyen en la inflamación al disminuir una citoquina inmunosupresora, como TGF-β.

Entre los factores analizados, que no mostraron asociaciones con mediadores inflamatorios, se destaca el TIF. Este resultado fue sorpresivo e inesperado ya que existe una extensa bibliografía en donde se relaciona al TIF con la mayor expresión de mediadores inflamatorios y con el DGF. Tal vez, la ausencia de diferencias significativas en el TIF entre el grupo DGF y los no DGF, puedan explicar estos resultados (Tabla 8).

De los factores derivados del receptor, la edad se correlacionó negativamente con TGF-β, mientras que el IMC se correlacionó positivamente con IFNA-1. Lo que indica que factores de riesgo relacionados al receptor se vinculan con mediadores tanto pro como antiinflamatorios. Sin embargo, analizando en su conjunto estos resultados, el receptor (y sus factores) parecería influir de manera clara en el DGF, jugando un papel destacado como factor pro-inflamógeno. Finalmente, se encontraron correlaciones con marcadores de funcionamiento renal, post-trasplante. Por ejemplo, se observó una correlación positiva entre IFNA-1 con el índice restrictivo renal (Eco Doppler) y una tendencia de correlación negativa con diuresis, es decir que a mayores niveles de la citoquina proinflamatoria peor funcionamiento tenía el órgano, lo que se vincula con lo observado en modelos animales de IRI donde se observó que la deficiencia de dicha citoquina reduce el daño renal[224]. Por el contrario, se observó una relación inversa a la descripta para IFNA-1, entre estos parámetros y TGF-β. A su vez, determinamos una correlación positiva entre HMOX-1 y glucemia, como ha sido descripto en modelos animales, donde al parecer la inducción sostenida de la expresión de HMOX-1 resultaría en una disminución de la hiperglucemia[225]. En resumen y a pesar del alto costo de la técnica, la utilización de un microarreglo posibilitó detectar mediadores que nos podrían permitir predecir el resultado del trasplante a corto plazo. La identificación de dichos mediadores fue beneficiosa para

comprender el mecanismo responsable del DGF y aportar conocimientos para idear estrategias tendientes a reducir sus consecuencias.

2. Biomarcador del estado del órgano a trasplantar en el líquido de perfusión.

Como fue mencionado en la introducción, el DGF es un factor crítico para la sobrevida del injerto, razón por la cual sería muy importante disponer de herramientas que permitan predecir cuales son los órganos que harán DGF de aquellos que no lo desarrollarán. Al respecto, otro objetivo de esta tesis fue buscar algún parámetro que sirviera como biomarcador que permitiera discernir el estado del órgano previo al trasplante. El marcador seleccionado fue el SLPI. La elección del mismo se fundamentó en que, el SLPI es una alarmina producida en respuesta a diferentes noxas y, además fue propuesto como marcador de daño renal agudo[49]. La muestra elegida donde medir SLPI, fue el líquido de perfusión con el que se realiza el lavado de los injertos previo al trasplante. Las ventajas de utilizar este líquido son claramente superiores al ser un líquido que se descarta y por lo tanto es un método completamente no invasivo

El volumen de líquido habitualmente utilizado para realizar el lavado del riñón, es variable y depende mucho de los cirujanos. En general se utilizan 500 ml, pero en la práctica perfunden al riñón hasta que del mismo comienza a salir líquido libre de sangre. Cabe señalar que en los primeros mililitros se obtiene un líquido que arrastra material (sangre, células) estacionado en el órgano, durante todo el proceso de almacenado en frío. Por esto, fue que se tomó la decisión de tomar dos fracciones del líquido de perfusión para medir al SLPI: los primeros 50 ml (SLPI-A) y los últimos 50 ml (SLPI-B).

Dado que existen factores de riesgo para el desarrollo de DGF lo primero que se determinó fue la existencia de correlación entre los niveles de SLPI y dichos factores de riego, entre ellos edad del donante, IMC del donante, creatinina pre-ablación y TIF. Del análisis de los resultados, concluimos que el nivel de SLPI-B podía ser un buen biomarcador de riesgo ya que observamos correlaciones positivas, con la edad del donante. Con respecto a estos resultados, existen trabajos clínicos que avalan el riesgo que conlleva este factor dado que, pacientes trasplantados con riñones provenientes de donantes añosos poseen peor pronóstico que aquellos trasplantados con órganos de donantes jóvenes[226].

Otro factor analizado fue el TIF. Al igual que lo observado con las biopsias, usando la determinación de SLPI en el líquido de perfusión no observamos una asociación entre el SLPI y el TIF, reforzando que el parámetro TIF no siempre se correlaciona con todos los mediadores inflamatorios. Con respecto al IMC y el SLPI en el líquido de perfusión, se pudo observar una tendencia de asociación entre el IMC y el SLPI-B. Esto concuerda con los resultados obtenidos en un trabajo retrospectivo donde se demostró que los pacientes que recibían órganos de donantes con alto IMC tenían mayor riesgo de sufrir DGF en el post-trasplante[227].

Otra manera de evaluar los factores de riesgo, es a través del KDPI. El KDPI es un índice, adoptado en el año 2014 por algunos médicos trasplantólogos, que a través de datos demográficos del donante permite resumir el riesgo de fracaso del injerto en un solo número. Resultados preliminares de ensayos clínicos demuestran la posible correlación entre DGF y KDPI[228]. En nuestras mediciones pudimos observar que los niveles de SLPI-B se correlacionan de manera directa con el KDPI y por lo tanto podría ser utilizado como un marcador que reemplace o complemente al KDPI. Es importante destacar que el KDPI es discutido ya que existen autores que lo postulan como un índice muy restrictivo. En un estudio retrospectivo donde la elección de la utilización del órgano a trasplantar se basó en biopsias pre-trasplante permitió establecer que, si se hubiera utilizado el KDPI como parámetro para la toma de decisión, se hubieran descartado más órganos resultando en un menor número de trasplantes [229]. Sin embargo, la implementación de biopsias para evaluar el estado del órgano a trasplantar, es un método invasivo.

De esta manera, nuestra técnica de medición de SLPI en el líquido de perfusión para evaluar el estado del órgano sería superior al KDPI, aunque para asegurarlo completamente deberíamos realizar un nuevo estudio clínico aumentando la cantidad de líquido de perfusión analizado y fundamentalmente, además realizar estudios simultáneos en biopsias donde se verifique inequívocamente el estado del injerto a trasplantar.

Las correlaciones halladas entre el SLPI y los factores de riesgo permitían especular sobre una posible asociación entre el SLPI en el líquido de perfusión y marcadores tempranos de funcionamiento renal, como por ejemplo la aparición de DGF y sus complicaciones. En efecto, tanto los pacientes que sufrieron DGF como aquellos que presentaron rechazo agudo dentro de los primeros 6 meses post-trasplante, mostraron tener niveles mayores de SLPI-B. Es importante destacar que hasta el momento se han propuesto muy pocos biomarcadores que permitan establecer el funcionamiento del órgano post-trasplante a corto plazo previo a su implantación. A su vez, otros

biomarcadores propuestos para la determinación del DGF son enzimas tubulares, así como proteínas de bajo peso molecular detectadas en orina o suero. Esto, contrasta con nuestra propuesta dada la facilidad de obtención de la muestra (líquido de perfusión) y teniendo en cuenta que durante el DGF, la diuresis está comprometida de forma tal que el uso de biomarcadores urinarios no sería valorable, y quedaría como opción métodos más invasivos [230]. Por lo tanto, la determinación de SLPI en el líquido de perfusión, permitiría a los médicos, por un lado, determinar tanto la utilización del órgano, así como también estar preparados para futuras complicaciones.

Todos los resultados hasta aquí discutidos con respecto al líquido de perfusión, tienen en cuenta al SLPI-B. Llamativamente los niveles de SLPI-A no evidenciaron los mismos resultados. Esto podría corresponder a la existencia de cierta interferencia vinculada a la carga sanguínea que presenta dicha muestra, ya que al ser los primeros 50 ml que se obtienen del lavado del órgano previo a la cirugía, suele presentar hemólisis y restos celulares, tal como fue mencionado más arriba.

3. Intervención terapéutica para reducir el DGF y el SPR

Otro aspecto a destacar en esta tesis, fue la posibilidad de evaluar el uso de un fármaco antioxidante con el objetivo de evitar o minimizar el retraso en la función del injerto. Las razones que llevaron a evaluar la utilización del antioxidante ALA fueron que, la formación de radicales libres participa en el proceso fisiopatológico del IRI sumado a su utilización en pacientes con neuropatía diabética presentando pocos o nulos efectos adversos. Como fue descripto, se llevaron a cabo tres protocolos clínicos. En primer lugar, se desarrolló el protocolo de pacientes con trasplante renopancreático. Es importante señalar que se decidió evaluar el uso del ALA en este tipo de pacientes ya que dicha droga, en la dosis utilizada en esta tesis, es la aprobada para el tratamiento de la neuropatía diabética por las autoridades reguladoras locales. Es decir, que todos los pacientes de dicho protocolo tenían indicación médica para su utilización, al menos por vía oral. De tal forma, la administración de ALA al momento del trasplante podría ser beneficiosa tanto por las complicaciones relacionadas a la diabetes en el receptor como por su efecto sobre el IRI.

Los primeros resultados obtenidos del estudio, fueron muy alentadores ya que rápidamente pudimos poner en evidencia que la utilización de ALA reducía algunos mediadores de la inflamación. Estos hallazgos, además, reforzaron los conocimientos que

se tenían sobre las consecuencias deletéreas de las EROs, como uno de los principales mecanismos responsables de la lesión del injerto en el trasplante de órganos sólidos. Sin embargo, la eficacia de las terapias antioxidantes ha sido cuestionada por una serie de estudios en los cuales no se observaban efectos beneficiosos. De hecho, en nuestro protocolo de trasplante renopacreático, el tratamiento del receptor con una única dosis de ALA en el momento de la cirugía (grupo R) no mejoró sustancialmente la mayoría de los parámetros inflamatorios o bioquímicos analizados dentro de las primeras semanas post-trasplante. A pesar de esto, sí se observó una tendencia a la mejoría en algunos parámetros clínicos (como pancreatitis y disfunción renal), incluso tratando sólo a los receptores del injerto. Esto nos hace pensar, que un mejor ajuste de las dosis de ALA y/o del momento de la administración podría mejorar el resultado del trasplante. De hecho, los estudios preclínicos con animales han demostrado mejores resultados con dosis altas de ALA (100 mg/kg) y han demostrado que dosis más bajas (10 mg/kg), como la utilizada en nuestro estudio, son menos efectivas[180]. Al respecto, cabe aclarar que no existen en el mercado ampollas de 600 mg de ALA. Esto implica que, para la administración de ALA, se necesitaron utilizar 12 ampollas de 50 mg, resultando una dificultad al momento de implementar este protocolo durante un proceso tan complejo como lo es el trasplante de un órgano.

Del conjunto de los resultados obtenidos con ALA, resultó muy llamativo lo observado en aquellos pacientes que además de recibir ALA en el momento de la cirugía, también recibían un órgano de un donante que había sido previamente tratado (grupo DR). Los resultados positivos, se obtuvieron en los parámetros inflamatorios y funcionales del injerto. De forma tal que la división en tres grupos experimentales, grupo control, grupo DR y grupo R permitió determinar principalmente la importancia del tratamiento al donante, indicando que en el donante cadavérico se está produciendo un fenómeno de activación inflamatoria que impacta de manera desfavorable en el injerto. De hecho, el análisis por RT- qPCR de mediadores en riñones y páncreas derivados de donantes tratados con ALA, demostró que éste favorecía la expresión diferencial de mediadores con un perfil antiinflamatorio o menos inflamatorio. Por ejemplo, en riñón se detectó baja expresión de C3 y alta de TGF-β y en páncreas una notable expresión de HMOX-1. A su vez se determinó una elevada expresión de C3 en el páncreas en comparación con los órganos derivados de donantes no tratados. En este sentido, es interesante destacar que recientemente se propuso que la clasificación original de C3a se cambiara de un

"mediador proinflamatorio" a un "modulador inflamatorio", basado en varias facetas antiinflamatorias encontradas para C3a *in vivo*[231].

Como se nombró previamente, uno de los factores analizados en las biopsias de los donantes tratados, fue HMOX-1. Diversos trabajos han descripto efectos benéficos de esta molécula antioxidante en varios modelos animales de IRI[232, 24]. Llamativamente en el riñón, una alta expresión de HMOX-1 parece estar asociada con un mal pronóstico, cabe destacar que en el estudio de mediadores inflamatorios en pacientes con DGF describimos un aumento de la expresión de dicha molécula, en consonancia con la bibliografía[232, 233]. A diferencia del riñón, en el páncreas, la regulación positiva de HMOX-1 puede prevenir la fibrosis al inhibir la proliferación de células estrelladas pancreáticas, de forma tal que el resultado obtenido en dicho órgano sería beneficioso[234]. El efecto global observado en las biopsias del grupo DR comparado con el grupo no tratado indica claramente un efecto beneficioso de ALA en el donante.

El precondicionamiento de los donantes para reducir IRI no es un nuevo concepto[235, 236]. En un modelo animal, el tratamiento con esteroides o la administración del ligando soluble de P-selectina al donante con muerte encefálica, aumentó la sobrevida del receptor en comparación con el grupo no tratado[236]. Además, en humanos, el tratamiento con esteroides al donante cadavérico, redujo la expresión de citocinas proinflamatorias[237]. De hecho, en nuestro estudio, el grupo DR tenía una expresión reducida de IL-8 e IL-6 (Figura 15), no así el grupo R. Por otra parte, la IL-10, considerada una citoquina antiinflamatoria, no mostró diferencias significativas en ningún grupo tratado. Es importante destacar que la eficacia de ALA en la disminución de los niveles de algunas citoquinas ya se describió durante la circulación extracorpórea[238]. Sin embargo, creemos que al administrar ALA inmediatamente antes de la ablación, estamos protegiendo al órgano de las EROs producidas durante el proceso de ablación, en lugar de proteger frente a la tormenta de citocinas, que comúnmente comienza más temprano en el donante con muerte encefálica.

Otro de los marcadores analizados para evaluar la eficacia del tratamiento, fue la proteína asociada a pancreatitis (PAP). Esta proteína ha sido detectada en el jugo pancreático posterior al trasplante[239, 240] y se describió como un buen marcador sérico para la lesión pancreática[241]. En pacientes que fueron tratados con ALA y a su vez recibieron injertos tratados, los niveles plasmáticos de PAP 12hs post-trasplante fueron significativamente menores en comparación a las 0 hs post-trasplante. Por otro lado, se pudo observar el mismo patrón para la alarmina SLPI. De hecho, se observó una fuerte correlación directa

entre PAP y SLPI (Figura 16C). Todos estos resultados indican que el tratamiento con ALA afecta los niveles de mediadores inflamatorios plasmáticos, y dicho efecto fue más pronunciado cuando, tanto el donante como el receptor fueron tratados. Sin embargo, ambos grupos de pacientes tratados (R y DR) presentaron una tendencia hacia una disminución en la incidencia de disfunción renal temprana y pancreatitis.

La complejidad de los múltiples mecanismos patológicos que causan disfunción renal y pancreatitis podría explicar la falta de una asociación ideal entre todos los marcadores inflamatorios analizados y el resultado clínico en el grupo R. Esta diferencia en los resultados según el tratamiento, sugieren que, el precondicionamiento del donante con ALA desempeña un papel protector importante, pero insistimos que es probable que sea necesario el ajuste de la dosis para observar resultados más significativos. A su vez, la administración de ALA en los días post-trasplante también podrían ayudar a mejorar los resultados. En general, el ALA es un fármaco bien tolerado que puede tener efectos secundarios menores, en nuestro estudio dichos efectos no han sido detectados.

Estos resultados indican que el uso de un antioxidante puede reducir los marcadores inflamatorios y mejorar algunos parámetros clínicos en trasplante renopancreático humano. De hecho, este estudio preliminar sugiere que el precondicionamiento con ALA puede ser adecuado para disminuir los marcadores inflamatorios durante los primeros días post-trasplante, lo que disminuiría posteriormente la incidencia de disfunción renal temprana y pancreatitis de injerto.

Posteriormente, luego de dar a conocer los resultados en trasplante renopancreático, se inició el protocolo en trasplante hepático. Su implementación se justificó por la alta morbimortalidad presente en este tipo de intervenciones en el período post-trasplante inmediato, con complicaciones severas por IRI. En estos casos, y con la experiencia ya adquirida con los trasplantes renopancreáticos, los pacientes se dividieron en un grupo control y un grupo tratado (donde el órgano recibía dos veces la administración de ALA, como en el grupo DR del protocolo renopancreático).

Los resultados obtenidos con la utilización de ALA en trasplante hepático, también evidenciaron resultados beneficiosos para los pacientes. Los estudios de los niveles de transcripto de mediadores en biopsias hepáticas, obtenidas luego de la reperfusión, indicaron cambios en la expresión de algunos genes, como por ejemplo disminución de PHD1 y PHD2. Llamativamente, estas enzimas se vinculan con la respuesta a hipoxia. Estas enzimas modulan post-traduccionalmente la actividad de la subunidad HIF-1α dado

que son las encargadas de hidroxilarlo y de esta forma favorecer su degradación. Ya que la presencia de oxígeno es un requisito para dicha actividad, este proceso se suprime en hipoxia permitiendo que el HIF-1α escape de la destrucción y permita la activación de la transcripción de genes blanco. Bernhardt W. *et al*, determinaron que el pretratamiento del órgano con un inhibidor de PHD2 mejoraba los resultados a corto y largo plazo después del trasplante alogénico en un modelo animal[208]. A su vez Schneider M. *et al*, observaron que tanto animales *knockout* para PHD1 como aquellos tratados con un shRNA para dicha enzima mostraban estar protegidos contra IRI hepático[242]. De forma tal, que la disminución de los niveles de transcripto en las biopsias estaría indicando una protección frente a la hipoxia generada por la isquemia. Por otra parte, debemos destacar que los niveles de transcripto de SLPI en el grupo tratado mostraron una tendencia a ser mayores que en el grupo control. No esta descripto en la bibliografía que el ALA induzca la expresión de SLPI. Sin embargo, Schneeberger *et al* analizaron la expresión endógena de SLPI en un modelo animal de trasplante cardíaco[48]. Estos investigadores determinaron que el SLPI aumenta en IRI y la falta de expresión del SLPI endógeno se vincula con un peor funcionamiento cardíaco postrasplante. La alta expresión de SLPI detectada, en nuestros estudios, a nivel local en los pacientes tratados con ALA indicaría una mayor protección tisular debido a su actividad antiinflamatoria y antiproteasa. Por el contrario, cuando se realizaron las mediciones de este mediador en plasma se observó que sus niveles eran menores en el grupo tratado en comparación con el grupo control; indicando que los pacientes tratados con ALA presentan un estado de menor inflamación sistémica, y por lo tanto menor nivel plasmático de la alarmina SLPI [243].

Otro de los transcriptos que mostró diferencia en sus niveles según el tratamiento fue Reg3a/PAP. En páncreas se sabe que aumenta su expresión frente a inflamación, sin embargo, sobre hígado no hay mucho descripto. Esta proteína en tejido hepático normal no suele ser detectada, pero en pacientes con cirrosis sus niveles séricos se encuentran elevados[243]. En este estudio, se determinó que las biopsias hepáticas de pacientes tratados con ALA tenían menores niveles de transcripto Reg3a/PAP comparado con los pacientes del grupo control. Por esta razón creemos que al ser una proteína que aumenta en inflamación, su expresión se induce en trasplante, y dicha disminución del transcripto entre el grupo tratado y control, estaría demostrando un menor nivel de inflamación en el tejido hepático de los pacientes trasplantados. Es interesante remarcar que estos resultados se reflejan también en los niveles plasmáticos. Los pacientes del grupo control

mostraron un aumento en los niveles de PAP al día 1 post-trasplante, a diferencia de los pacientes tratados con el antioxidante, que mantuvieron sus valores constantes.

Desde el punto de vista clínico, en el trasplante hepático se puede presentar una complicación temprana con graves implicancias denominado síndrome post-reperfusión (SPR). La incidencia de este síndrome varía en gran medida entre diferentes estudios, en los que va desde un 12%[244, 245] a un 77%[246]. Esta variabilidad, podría resultar de la población estudiada, del manejo terapéutico, e incluso a la definición establecida para el SPR en cada centro. A pesar de esta variabilidad, es una complicación que aumenta la mortalidad perioperatoria para la cual no existe un tratamiento eficaz de prevención[129, 247]. Por esta razón es importante destacar la gran diferencia de incidencia del SPR en nuestro estudio, entre el grupo tratado versus el grupo control. De esta manera, y al igual que en trasplante renopancreático, la administración de ALA parece tener un efecto beneficioso, al menos en el período post-trasplante inmediato.

Como fue mencionado previamente, el riñón también sufre consecuencias en el período post-trasplante inmediato que se caracteriza con el denominado DGF. Por lo tanto, era lógico comenzar con otro ensayo clínico en trasplante renal para observar el efecto de la administración de ALA. Sin embargo, para este protocolo no fue posible administrar ALA al donante, pero sí se pudo perfundir la droga al órgano a trasplantar en el quirófano, previo al trasplante. Los resultados preliminares hasta aquí obtenidos con ALA en trasplante renal, no pudieron demostrar un efecto benéfico sobre la aparición del DGF, pero se pudo advertir, que los pacientes de la Rama Control necesitaron más sesiones de diálisis, para mantener la homeostasis, en comparación con la Rama Activa. Lo cual es interesante, no sólo por el costo de la diálisis sino también por la calidad de vida de los pacientes.

Todos los protocolos clínicos con ALA continúan realizándose para llegar a un número mínimo de pacientes, para lograr no sólo una publicación sino también la presentación a la ANMAT para obtener una nueva indicación de ALA en trasplante.

4. Administración de SLPI en modelos animales de daño renal.

Otro objetivo evaluado en esta tesis fue el estudio de la función de la alarmina SLPI en la fisiopatología del trasplante de órganos sólidos vascularizados, estudiando en primer

lugar su potencialidad como inmunomodulador en un modelo de rata de daño por isquemia reperfusión renal. En este modelo se pudo demostrar que la administración del SLPI tiene un efector protector, dado que disminuyó la urea y creatinina plasmática al igual que la NTA. Evidentemente, estos resultados son muy relevantes, ya que permiten postular al SLPI como un nuevo tratamiento que permitiría reducir el IRI, y así reducir el DGF. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Lentsch *et al* [47] en hígado, quien demostró que el SLPI endógeno tiene un efecto protector en el IRI hepático. En este trabajo se observó que el bloqueo del SLPI endógeno, aumentó la expresión de citoquinas proinflamatorias y la acumulación de PMN. En el mismo trabajo, también se pudo observar que al administrar SLPI exógeno se produjo una disminución de TNF-α y CXCL2. Nosotros pudimos extender estos hallazgos al demostrar que el tratamiento con SLPI redujo el reclutamiento de monocitos/macrófagos medido por la expresión de *clusters* de diferenciación típicos como CD68 para macrófagos y CD14 para monocitos. Este resultado podría deberse a la disminución en los niveles de expresión de CCL2; siendo la principal proteína quimioatractante de monocitos. En cambio, la expresión de otra quimiocina (para neutrófilos) como CXCL2 no mostró diferencias estadísticamente significativas. Todos estos datos nos permiten plantear un posible mecanismo de acción en el cual el SLPI previene el daño tisular, evitando el reclutamiento de CPA al tejido isquémico modificando el perfil de expresión de determinados quimioatractantes.

Un aspecto relevante de esta tesis fue demostrar que los efectos nefroprotectores del SLPI no se circunscriben a modelos de daño por isquemia reperfusión renal, ya que el efecto protector también se observó en un modelo de nefrotoxicidad por gentamicina. De esta manera podemos especular que el fenómeno de protección del SLPI no se daría sólo por su efecto sobre el sistema inmune, sino también a través de un efecto directo sobre el parénquima renal, dado que el sistema inmune no está involucrado de forma directa en la fisiopatología del daño por gentamicina.

5. Función de SLPI en trasplantes renales humanos.

El efecto nefroprotector del SLPI en los modelos animales nos impulsó a estudiar el rol fisiológico de esta proteína en pacientes trasplantados renales, estudiando inicialmente la expresión de transcriptos en riñones al momento del trasplante. Del análisis de estos estudios pudimos concluir que la expresión de SLPI se correlacionaba en forma directa

con mediadores con actividad antiinflamatoria como TGF-β y HMOX-1, dos transcriptos que también se modificaron en las biopsias de los pacientes tratados con ALA en los protocolos clínicos renopancreáticos. En la bibliografía existen trabajos que demuestran la función de estos mediadores en IRI. En un modelo de IRI renal, Qiunong *et al* mostró que la ausencia de TGF-β aumentaba el daño. Así como también fue descripto que los niveles de HMOX-1 aumentan por IRI, como retroalimentación negativa con el fin de minimizar el daño[248]. Dada la correlación positiva descrita y su actividad antiinflamatoria, creemos que el SLPI se comportaría de igual forma. Esta hipótesis se reforzaría por los resultados funcionales observados a corto plazo, donde se evidenció que aquellos pacientes que tuvieron mayores niveles de transcripto en la biopsia al momento del trasplante, tuvieron menores niveles de creatinina al décimo día. Es importante destacar que también en el protocolo de trasplante hepático, los niveles de transcripto de SLPI se vieron aumentados en los pacientes tratados con ALA, los cuales presentaron menos SPR. En conjunto estos resultados estarían avalando un rol protector del SLPI a nivel local en los tejidos. A la vez, que podrían servir como biomarcador de la evolución del trasplante a corto plazo. Aunque la practicidad del mismo estaría comprometida al tratarse de biopsias.

Cuando estudiamos los niveles plasmáticos de SLPI en pacientes trasplantados renales, los resultados protectores no fueron tan claros como esperábamos en un primer momento ya que existe una correlación positiva con la creatinina. Lo que creímos podía deberse a varias cuestiones. En primera instancia, pensamos sobre la existencia de un estado de refractariedad del sistema inmune a la acción del SLPI, tal como lo habíamos descripto en trabajos previos del laboratorio, para pacientes tuberculosos[211]. Sin embargo, esta hipótesis resulto falsa al demostrar que la proliferación de CMSP en respuesta a PHA de los pacientes inmunosuprimidos es inhibida por SLPI, tal como lo hacen con CMSP derivadas de individuos sanos. Por otro lado, un dato interesante e inesperado fue la correlación indirecta entre la proliferación leucocitaria con los niveles plasmáticos de SLPI en los pacientes trasplantados, sugiriendo que el SLPI endógeno al igual que el exógeno genera una inhibición de la proliferación, favoreciendo la inmunosupresión en el paciente.

Otro aspecto analizado para explicar la correlación directa entre los niveles de SLPI y los niveles de creatinina plasmática, fue la metabolización renal del SLPI en los pacientes trasplantados. La metabolización del SLPI por el riñón ha sido descripta previamente[210]. De hecho, los pacientes en el pre-trasplante presentan niveles muy altos de SLPI, los que se reducen luego del trasplante, sugiriendo que el mejoramiento de la función renal permite una mejor depuración del SLPI. Sin embargo, los niveles de SLPI continúan

siendo altos en los pacientes trasplantados en comparación a los valores hallados en voluntarios sanos. Estos valores elevados que, además con el tiempo de trasplante van disminuyendo, podrían deberse a una mayor producción de SLPI por presencia de estímulos inductores en el paciente trasplantado. De hecho, nosotros demostramos que monocitos derivados de pacientes trasplantados responden con una mayor producción de SLPI en respuesta a células epiteliales apoptóticas (Figura 39). Este mismo efecto fue descripto por Odaka *et al* quien describió la producción de SLPI mediante monocitos/macrófagos murinos expuestos a células apoptóticas. Por lo tanto, es probable que en los pacientes trasplantados los niveles plasmáticos de SLPI correspondan a una mayor producción de SLPI y/o a una menor metabolización renal, aunque tampoco podemos descartar la presencia de factores inhibidores de SLPI. Entre estos últimos, se destaca el IFNγ que en individuos sanos reduce los niveles de SLPI[211]. De hecho, IFNγ puede estar incrementado en los episodios de rechazo del injerto,

Los niveles plasmáticos de SLPI son el resultado de múltiples factores. Por lo tanto, creemos que la posibilidad que el SLPI plasmático pueda servir como biomarcador de daño o protección, dependerá de la manera en que se mesure cada uno de los factores involucrados. Siendo la metabolización renal un factor importante, la relación SLPI/creatininemia podría ser un índice apropiado para ser utilizado como biomarcador. De hecho, nosotros pudimos establecer un rango de normalidad de este índice (con un valor de mediana de 43,1) en base al percentilo 10 y 90 de 28,3 y 78,2, respectivamente, que nos permitió evidenciar pacientes que estaban cursando episodios de rechazos o que cursaron episodios de rechazos dentro de los seis meses siguiente a la determinación del índice. Estos resultados son muy promisorios, aunque aún no podemos saber a ciencia cierta, la fuerza que podrá tener este índice para poner de manifiesto rechazos clínicos o subclínicos, y la posibilidad de distinguir entre rechazos u otras complicaciones. Para ello, deberemos aumentar el número de pacientes con rechazos y la comprobación de los mismos a través de la realización de biopsias. Por ahora, tampoco podemos saber, si este índice podrá discriminar entre episodios de infección y rechazos o si la terapia inmunosupresora puede influir en el índice. Lo único que podemos afirmar, es que un índice elevado o muy bajo es una señal de alarma que requiere de un estudio más exhaustivo del paciente.

Más allá de la posibilidad de utilizar al SLPI como biomarcador, surge la incógnita sobre la función que cumple en el organismo. Previamente, mencionamos sobre un efecto benéfico al suprimir la respuesta inmune, pero además aparentemente ejerce

mecanismos de protección directos sobre el parénquima renal. Estos resultados son avalados al incubar células epiteliales tubulares renales humanas con diferentes concentraciones de SLPI. Este efecto se demostró *in vitro*, por diferentes técnicas, utilizando distintos modelos de nefrotoxicidad como ser la deprivación de suero o la incubación con altas concentraciones de un inhibidor de calcineurina. Este último hallazgo es de suma relevancia clínica, ya que el tacrolimus es un inhibidor de calcineurina y uno de los principales y más eficientes inmunosupresores utilizados en la clínica. La presencia de toxicidad por tacrolimus obliga al médico a cambiar el tratamiento inmunosupresor por algún otro inmunosupresor menos eficiente o con más efectos adversos. Por lo tanto, es posible especular con una futura utilización de SLPI, que tenga como objetivo reducir la nefrotoxicidad aumentando la sobrevida de los órganos trasplantados.

Los mecanismos de nefroprotección del SLPI sobre las células epiteliales fueron examinados utilizando un microarreglo. Estos experimentos nos mostraron las posibles vías involucradas en este mecanismo nefroprotector. El FK506 aumentó notablemente los niveles de transcriptos relacionados con muerte celular (BECN1), hipoxia (BNIP3L), estrés osmótico (SLC5A3) y respuesta inflamatoria (CCL2). Por el contrario, el co-tratamiento con SLPI disminuyó los niveles de ARNm inducidos por FK506 y notablemente aumentó los niveles de ARNm de proteínas de choque térmico (ATF4, ATF6, HSP90AA1) y TLR4, que corresponde a uno de los receptores para estas proteínas (Figura 38). De todos estos resultados, es llamativa la mayor expresión de las proteínas de choque térmico inducido por SLPI en presencia de tacrolimus (FK506). El aumento de las mismas, no sería extraño en las células tratadas con el inhibidor de calcineurina, ya que las proteínas de choque térmico aumentan por muchos factores de estrés como aumento o disminución de temperatura, cambios en la presión osmótica, sustancias tóxicas (como en este caso), cambios de pH, isquemia, entre muchas otras situaciones estresantes. Sin embargo, resulta extraño que el SLPI incremente aún más los niveles de estas proteínas, excepto que se comprenda la función de las mismas. Como se sabe, las proteínas de choque térmico ayudan a la célula a conservar o degradar las proteínas desnaturalizadas por el fenómeno estresante, uniéndose a ellas para evitar que se agreguen, marcándolas para luego destruirlas, o manteniendo las cadenas de polipéptidos desplegadas en un estado competente. De esta manera, el SLPI incrementa las herramientas para que, desaparecido el factor estrés, las proteínas puedan volver al plegamiento inicial, recuperando su conformación tridimensional y por lo tanto recuperar su función intracelular. Entre otras palabras, el SLPI no cura, pero prolongaría la posibilidad de

viabilidad celular siempre y cuando el estímulo estresor desaparezca o amaine su actividad.

Es probable que el efecto del SLPI no sólo sea mediado a través del aumento de la actividad chaperona, ya que también se observó una disminución de CCL2. Este resultado concuerda con lo observado en el modelo de IRI renal cuando los animales eran tratados con SLPI, de forma tal que la inhibición del reclutamiento de monocitos sería uno de los mecanismos por los cuales el SLPI minimizaría el daño. De esta manera, podríamos concluir que el efecto del SLPI sería mediado a través de un efecto directo sobre las células renales y un efecto indirecto sobre el sistema inmune.

Es necesario remarcar que existen otras variables que influyen sobre los niveles de SLPI. Entre ellos, y uno de los más significativos es el tiempo transcurrido desde el trasplante, en donde se observa que a medida que el tiempo transcurre, los niveles séricos de SLPI disminuyen. Estos datos estarían indicando que a mayor tiempo post-trasplante habría una menor presencia de estímulos inductores de SLPI, siendo una de las consecuencias la menor capacidad protectora, dejando a los riñones más susceptibles a noxas tales como respuestas inmunitarias alogénicas e incluso fármacos nefrotóxicos.

Dado este conjunto de resultados, postulamos que, además de la probable metabolización renal del SLPI, en los pacientes trasplantados renales existiría un mecanismo de control, donde los niveles de SLPI aumentan en respuesta al daño con el objetivo de minimizar la muerte celular. Si este fuera el caso, hipotetizamos que los pacientes con niveles elevados de SLPI deberían tener una evolución a corto plazo diferencial con respecto a los pacientes con niveles bajos de SLPI. Sin embargo, la exteriorización de este mecanismo protector *in vivo*, dependerá de la eliminación de los estímulos que llevan al incremento de SLPI. Para lo cual deberíamos evaluar un número mayor de pacientes.

Por último, también es importante señalar la función diferencial del SLPI local vs el sistémico. El SLPI local, encontrado en las biopsias, se asocia con resultados de buen funcionamiento renal a corto plazo. En cambio, el SLPI sistémico, y aún el encontrado en el líquido de perfusión, se asocian con resultados de peor funcionamiento renal, probablemente al actuar como biomarcador de daño.

En conjunto todos estos resultados no solo avalan la función nefroprotectora del SLPI, sino que también lo postulan como posible biomarcador de la función renal a corto plazo.

Conclusiones

En esta Tesis Doctoral hemos demostrado que:

- Existen mediadores inflamatorios que poseen una expresión diferencial entre pacientes que sufren DGF y aquellos que no, en particular TGF- β, IFNA1, IL-1R1, y HMOX-1.

- Estos mediadores se vinculan con factores de riesgo tanto del donante como del receptor para el desarrollo del DGF. En particular TGF-β se correlacionó negativamente con la edad del donante y la creatinina de pre-ablación, así como también con la edad del receptor. Mientras que IFNA1 se correlacionó positivamente con el IMC del receptor.

- A mejor función renal, mayor nivel de TGF- β y menores de IFNA1, y HMOX-1.

- Pacientes que sufrieron DGF tuvieron niveles de SLPI elevados en el líquido de perfusión. Pacientes que sufrieron rechazo dentro de los 6 meses post-trasplante tuvieron niveles de SLPI altos en el líquido de perfusión.

- El precondicionamiento con ALA del órgano a trasplantar, reduce los niveles de citoquinas inflamatorias como IL-8 e IL-6, alarminas plasmáticas como SLPI y PAP, y mejora el resultado del trasplante a corto plazo.

- En modelos animales, el tratamiento con SLPI es capaz de disminuir el daño renal agudo generado ya sea por IRI o toxicidad.

- El SLPI inhibe la proliferación leucocitaria de CMSP de pacientes trasplantados renales.

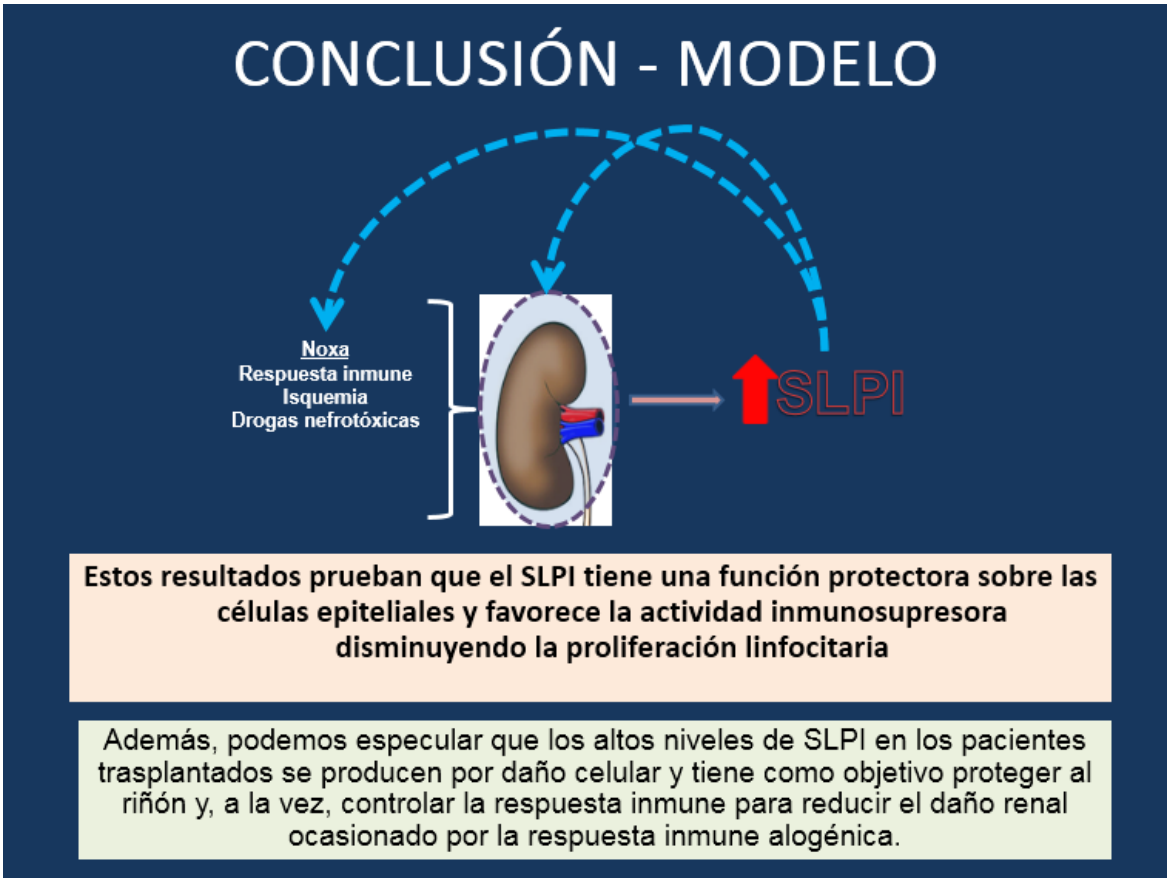
- Pacientes trasplantados renales que poseen niveles elevados de SLPI endógeno muestran tener una menor capacidad proliferativa linfocitaria *in vitro*.

- El SLPI tiene capacidad de disminuir la apoptosis de células tubulares renales *in vitro,* reduciendo mediadores vinculados a la hipoxia, estrés osmótico, muerte celular y factores quimiotácticos de monocitos, y aumentando proteínas de choque térmico y TLR4.

- Los monocitos de pacientes trasplantados aumentan la expresión de SLPI en respuesta a células apoptóticas.

- Pacientes trasplantados con índices altos y bajos de SLPI/creatinina tienen mayor probabilidad de estar cursando episodios de rechazos.

Todos estos resultados nos permiten postular el siguiente modelo:



Bibliografía

1. 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)**:** 6692-6696.
2. 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. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 1998, **19**(6)**:** 875-880.
3. Stetler G, Brewer MT, Thompson RC. Isolation and sequence of a human gene encoding a potent inhibitor of leukocyte proteases. *Nucleic Acids Res* 1986, **14**(20)**:** 7883-7896.
4. Grutter MG, Fendrich G, Huber R, Bode W. The 2.5 A X-ray crystal structure of the acid-stable proteinase inhibitor from human mucous secretions analysed in its complex with bovine alpha-chymotrypsin. *Embo J* 1988, **7**(2)**:** 345-351.
5. McGarry N, Greene CM, McElvaney NG, Weldon S, Taggart CC. The Ability of Secretory Leukocyte Protease Inhibitor to Inhibit Apoptosis in Monocytes Is Independent of Its Antiprotease Activity. *Journal of immunology research* 2015, **2015:** 507315.
6. Moriyama A, Shimoya K, Kawamoto A, Hashimoto K, Ogata I, Kunishige I*, et al.* Secretory leukocyte protease inhibitor (SLP) concentrations in seminal plasma: SLPI restores sperm motility reduced by elastase. *Mol Hum Reprod* 1998, **4**(10)**:** 946-950.
7. Moriyama A, Shimoya K, Ogata I, Kimura T, Nakamura T, Wada H*, et al.* Secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) concentrations in cervical mucus of women with normal menstrual cycle. *Mol Hum Reprod* 1999, **5**(7)**:** 656-661.
8. Ohlsson K, Bjartell A, Lilja H. Secretory leucocyte protease inhibitor in the male genital tract: PSA-induced proteolytic processing in human semen and tissue localization. *J Androl* 1995, **16**(1)**:** 64-74.
9. De Water R, Willems LN, Van Muijen GN, Franken C, Fransen JA, Dijkman JH*, et al.* Ultrastructural localization of bronchial antileukoprotease in central and peripheral human airways by a gold-labeling technique using monoclonal antibodies. *Am Rev Respir Dis* 1986, **133**(5)**:** 882-890.
10. Si-Tahar M, Merlin D, Sitaraman S, Madara JL. Constitutive and regulated secretion of secretory leukocyte proteinase inhibitor by human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 2000, **118**(6)**:** 1061-1071.
11. Wiedow O, Harder J, Bartels J, Streit V, Christophers E. Antileukoprotease in human skin: an antibiotic peptide constitutively produced by keratinocytes. *Biochemical and biophysical research communications* 1998, **248**(3)**:** 904-909.
12. Nystrom M, Bergenfeldt M, Ljungcrantz I, Lindeheim A, Ohlsson K. Production of secretory leucocyte protease inhibitor (SLPI) in human pancreatic beta-cells. *Mediators Inflamm* 1999, **8**(3)**:** 147-151.
13. Ohlsson S, Ljungkrantz I, Ohlsson K, Segelmark M, Wieslander J. Novel distribution of the secretory leucocyte proteinase inhibitor in kidney. *Mediators Inflamm* 2001, **10**(6)**:** 347-350.
14. Doumas S, Kolokotronis A, Stefanopoulos P. Anti-inflammatory and antimicrobial roles of secretory leukocyte protease inhibitor. *Infect Immun* 2005, **73**(3)**:** 1271-1274.
15. Jin F, Nathan CF, Radzioch D, Ding A. Lipopolysaccharide-related stimuli induce expression of the secretory leukocyte protease inhibitor, a macrophage-derived lipopolysaccharide inhibitor. *Infect Immun* 1998, **66**(6)**:** 2447-2452.
16. Sallenave JM, Shulmann J, Crossley J, Jordana M, Gauldie J. Regulation of secretory leukocyte proteinase inhibitor (SLPI) and elastase-specific inhibitor (ESI/elafin) in human airway epithelial cells by cytokines and neutrophilic enzymes. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1994, **11**(6)**:** 733-741.
17. 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, **278**(1)**:** L51-58.

18. Jaumann F, Elssner A, Mazur G, Dobmann S, Vogelmeier C. Transforming growth factor-beta1 is a potent inhibitor of secretory leukoprotease inhibitor expression in a bronchial epithelial cell line. Munich Lung Transplant Group. *Eur Respir J* 2000, **15**(6)**:** 1052-1057.
19. Costa MJ. MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE SLPI: IMPLICANCIAS EN LA RESPUESTA INMUNE. Buenos Aires; 2006. p. 43.
20. Taggart CC, Cryan SA, Weldon S, Gibbons A, Greene CM, Kelly E*, et al.* Secretory leucoprotease inhibitor binds to NF-kappaB binding sites in monocytes and inhibits p65 binding. *The Journal of experimental medicine* 2005, **202**(12)**:** 1659-1668.
21. Zabieglo K, Majewski P, Majchrzak-Gorecka M, Wlodarczyk A, Grygier B, Zegar A*, et al.* The inhibitory effect of secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) on formation of neutrophil extracellular traps. *Journal of leukocyte biology* 2015, **98**(1)**:** 99-106.
22. Ma G, Greenwell-Wild T, Lei K, Jin W, Swisher J, Hardegen N*, et al.* Secretory leukocyte protease inhibitor binds to annexin II, a cofactor for macrophage HIV-1 infection. *The Journal of experimental medicine* 2004, **200**(10)**:** 1337-1346.
23. Tseng CC, Tseng CP. Identification of a novel secretory leukocyte protease inhibitor-binding protein involved in membrane phospholipid movement. *FEBS Lett* 2000, **475**(3)**:** 232-236.
24. Eisenberg SP, Hale KK, Heimdal P, Thompson RC. Location of the protease-inhibitory region of secretory leukocyte protease inhibitor. *J Biol Chem* 1990, **265**(14)**:** 7976-7981.
25. Zhu J, Nathan C, Jin W, Sim D, Ashcroft GS, Wahl SM*, et al.* Conversion of proepithelin to epithelins: roles of SLPI and elastase in host defense and wound repair. *Cell* 2002, **111**(6)**:** 867-878.
26. Moreau T, Baranger K, Dade S, Dallet-Choisy S, Guyot N, Zani ML. Multifaceted roles of human elafin and secretory leukocyte proteinase inhibitor (SLPI), two serine protease inhibitors of the chelonianin family. *Biochimie* 2008, **90**(2)**:** 284-295.
27. Birrer P, McElvaney NG, Rudeberg A, Sommer CW, Liechti-Gallati S, Kraemer R*, et al.* Protease-antiprotease imbalance in the lungs of children with cystic fibrosis. *American journal of respiratory and critical care medicine* 1994, **150**(1)**:** 207-213.
28. Sallenave JM. Antimicrobial activity of antiproteinases. *Biochemical Society transactions* 2002, **30**(2)**:** 111-115.
29. Gomez SA, Arguelles CL, Guerrieri D, Tateosian NL, Amiano NO, Slimovich R*, et al.* Secretory leukocyte protease inhibitor: a secreted pattern recognition receptor for mycobacteria. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2009, **179**(3)**:** 247-253.
30. Nishimura J, Saiga H, Sato S, Okuyama M, Kayama H, Kuwata H*, et al.* Potent antimycobacterial activity of mouse secretory leukocyte protease inhibitor. *Journal of immunology* 2008, **180**(6)**:** 4032-4039.
31. Hiemstra PS, Maassen RJ, Stolk J, Heinzel-Wieland R, Steffens GJ, Dijkman JH. Antibacterial activity of antileukoprotease. *Infection and immunity* 1996, **64**(11)**:** 4520-4524.
32. Verma C, Seebah S, Low SM, Zhou L, Liu SP, Li J*, et al.* Defensins: antimicrobial peptides for therapeutic development. *Biotechnology journal* 2007, **2**(11)**:** 1353-1359.
33. McNeely TB, Shugars DC, Rosendahl M, Tucker C, Eisenberg SP, Wahl SM. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 infectivity by secretory leukocyte protease inhibitor occurs prior to viral reverse transcription. *Blood* 1997, **90**(3)**:** 1141-1149.
34. Henriksen PA, Hitt M, Xing Z, Wang J, Haslett C, Riemersma RA*, et al.* Adenoviral gene delivery of elafin and secretory leukocyte protease inhibitor attenuates NF-kappa B-dependent inflammatory responses of human endothelial cells and macrophages to atherogenic stimuli. *Journal of immunology* 2004, **172**(7)**:** 4535-4544.
35. Greene CM, McElvaney NG, O'Neill SJ, Taggart CC. Secretory leucoprotease inhibitor impairs Toll-like receptor 2- and 4-mediated responses in monocytic cells. *Infect Immun* 2004, **72**(6)**:** 3684-3687.
36. Taggart CC, Greene CM, McElvaney NG, O'Neill S. Secretory leucoprotease inhibitor prevents lipopolysaccharide-induced IkappaBalpha degradation without affecting phosphorylation or ubiquitination. *The Journal of biological chemistry* 2002, **277**(37)**:** 33648-33653.

37. Sano C, Shimizu T, Sato K, Kawauchi H, Tomioka H. Effects of secretory leucocyte protease inhibitor on the production of the anti-inflammatory cytokines, IL-10 and transforming growth factor-beta (TGF-beta), by lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *Clin Exp Immunol* 2000, **121**(1)**:** 77-85.
38. Jin FY, Nathan C, Radzioch D, Ding A. Secretory leukocyte protease inhibitor: a macrophage product induced by and antagonistic to bacterial lipopolysaccharide. *Cell* 1997, **88**(3)**:** 417-426.
39. Angelov N, Moutsopoulos N, Jeong MJ, Nares S, Ashcroft G, Wahl SM. Aberrant mucosal wound repair in the absence of secretory leukocyte protease inhibitor. *Thrombosis and haemostasis* 2004, **92**(2)**:** 288-297.
40. 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, **6**(10)**:** 1147-1153.
41. Sumi Y, Muramatsu H, Hata K, Ueda M, Muramatsu T. Secretory leukocyte protease inhibitor is a novel inhibitor of fibroblast-mediated collagen gel contraction. *Experimental cell research* 2000, **256**(1)**:** 203-212.
42. Sehnert B, Cavcic A, Bohm B, Kalden JR, Nandakumar KS, Holmdahl R*, et al.* Antileukoproteinase: modulation of neutrophil function and therapeutic effects on anti-type II collagen antibody-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 2004, **50**(7)**:** 2347-2359.
43. Guazzone VA, Guerrieri D, Jacobo P, Glisoni RJ, Chiappetta D, Lustig L*, et al.* Micro-encapsulated secretory leukocyte protease inhibitor decreases cell-mediated immune response in autoimmune orchitis. *Life sciences*, **89**(3-4)**:** 100-106.
44. Mulligan MS, Desrochers PE, Chinnaiyan AM, Gibbs DF, Varani J, Johnson KJ*, et al.* In vivo suppression of immune complex-induced alveolitis by secretory leukoproteinase inhibitor and tissue inhibitor of metalloproteinases 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1993, **90**(24)**:** 11523-11527.
45. Guerrieri D, Tateosian NL, Maffia PC, Reiteri RM, Amiano NO, Costa MJ*, et al.* Serine leucocyte proteinase inhibitor-treated monocyte inhibits human CD4(+) lymphocyte proliferation. *Immunology*, **133**(4)**:** 434-441.
46. Samsom JN, van der Marel AP, van Berkel LA, van Helvoort JM, Simons-Oosterhuis Y, Jansen W*, et al.* Secretory leukoprotease inhibitor in mucosal lymph node dendritic cells regulates the threshold for mucosal tolerance. *Journal of immunology* 2007, **179**(10)**:** 6588-6595.
47. Lentsch AB, Yoshidome H, Warner RL, Ward PA, Edwards MJ. Secretory leukocyte protease inhibitor in mice regulates local and remote organ inflammatory injury induced by hepatic ischemia/reperfusion. *Gastroenterology* 1999, **117**(4)**:** 953-961.
48. Schneeberger S, Hautz T, Wahl SM, Brandacher G, Sucher R, Steinmassl O*, et al.* The effect of secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) on ischemia/reperfusion injury in cardiac transplantation. *Am J Transplant* 2008, **8**(4)**:** 773-782.
49. Wilflingseder J, Sunzenauer J, Toronyi E, Heinzel A, Kainz A, Mayer B*, et al.* Molecular pathogenesis of post-transplant acute kidney injury: assessment of whole-genome mRNA and miRNA profiles. *PloS one* 2014, **9**(8)**:** e104164.
50. Arias M CJ, Morales JM (ed). *Insuficiencia renal crónica: alternativas terapéuticas*. Grupo 2 Comunicación Médica: Madrid, 2005.
51. Sollinger HW, Odorico JS, Becker YT, D'Alessandro AM, Pirsch JD. One thousand simultaneous pancreas-kidney transplants at a single center with 22-year follow-up. *Ann Surg* 2009, **250**(4)**:** 618-630.
52. Ojo AO, Meier-Kriesche HU, Hanson JA, Leichtman A, Magee JC, Cibrik D*, et al.* The impact of simultaneous pancreas-kidney transplantation on long-term patient survival. *Transplantation* 2001, **71**(1)**:** 82-90.
53. Nakache R, Tyden G, Groth CG. Quality of life in diabetic patients after combined pancreas-kidney or kidney transplantation. *Diabetes* 1989, **38 Suppl 1:** 40-42.
54. Solders G, Tyden G, Persson A, Groth CG. Improvement of nerve conduction in diabetic neuropathy. A follow-up study 4 yr after combined pancreatic and renal transplantation. *Diabetes* 1992, **41**(8)**:** 946-951.

55. Wolfe RA, Ashby VB, Milford EL, Ojo AO, Ettenger RE, Agodoa LY*, et al.* Comparison of mortality in all patients on dialysis, patients on dialysis awaiting transplantation, and recipients of a first cadaveric transplant. *N Engl J Med* 1999, **341**(23)**:** 1725-1730.
56. Shrestha BM, Haylor JL. Factors influencing long-term outcomes following renal transplantation: a review. *JNMA J Nepal Med Assoc* 2007, **46**(167)**:** 136-142.
57. Goldberg AC, Rizzo LV. MHC structure and function - antigen presentation. Part 1. *Einstein* 2015, **13**(1)**:** 153-156.
58. Koo TY, Yang J. Current progress in ABO-incompatible kidney transplantation. *Kidney research and clinical practice* 2015, **34**(3)**:** 170-179.
59. Raut V, Uemoto S. Management of ABO-incompatible living-donor liver transplantation: past and present trends. *Surgery today* 2011, **41**(3)**:** 317-322.
60. Ojo AO. Expanded criteria donors: process and outcomes. *Seminars in dialysis* 2005, **18**(6)**:** 463-468.
61. Uemura T, Nikkel LE, Hollenbeak CS, Ramprasad V, Schaefer E, Kadry Z. How can we utilize livers from advanced aged donors for liver transplantation for hepatitis C? *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation* 2012, **25**(6)**:** 671-679.
62. Veroux M, Grosso G, Corona D, Mistretta A, Giaquinta A, Giuffrida G*, et al.* Age is an important predictor of kidney transplantation outcome. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 2012, **27**(4)**:** 1663-1671.
63. Ojo AO, Leichtman AB, Punch JD, Hanson JA, Dickinson DM, Wolfe RA*, et al.* Impact of pre-existing donor hypertension and diabetes mellitus on cadaveric renal transplant outcomes. *Am J Kidney Dis* 2000, **36**(1)**:** 153-159.
64. Metzger RA, Delmonico FL, Feng S, Port FK, Wynn JJ, Merion RM. Expanded criteria donors for kidney transplantation. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 2003, **3 Suppl 4:** 114-125.
65. Freeman RB, Jr. The 'indirect' effects of cytomegalovirus infection. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 2009, **9**(11)**:** 2453-2458.
66. Cao S, Cox KL. Epstein-Barr virus lymphoproliferative disorders after liver transplantation. *Clinics in liver disease* 1997, **1**(2)**:** 453-469, x-xi.
67. Pischon T, Sharma AM. Obesity as a risk factor in renal transplant patients. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 2001, **16**(1)**:** 14-17.
68. Yu TM, Lin CC, Shu KH, Chuang YW, Huang ST, Chen CH*, et al.* Increased risk of hepatic complications in kidney transplantation with chronic virus hepatitis infection: A nationwide population-based cohort study. *Scientific reports* 2016, **6:** 21312.
69. Forman LM, Lewis JD, Berlin JA, Feldman HI, Lucey MR. The association between hepatitis C infection and survival after orthotopic liver transplantation. *Gastroenterology* 2002, **122**(4)**:** 889-896.
70. Meier-Kriesche HU, Port FK, Ojo AO, Rudich SM, Hanson JA, Cibrik DM*, et al.* Effect of waiting time on renal transplant outcome. *Kidney international* 2000, **58**(3)**:** 1311-1317.
71. Antonio José Bonilla R. PPM, Martha Guativa Suescún. Aspectos Perioperatorios del Trasplante Renal. *Revista Colombiana de Anestesiologia* 2007, **35:** 8.
72. Tennankore KK, Kim SJ, Alwayn IP, Kiberd BA. Prolonged warm ischemia time is associated with graft failure and mortality after kidney transplantation. *Kidney international* 2016, **89**(3)**:** 648-658.
73. Sert I, Colak H, Tugmen C, Dogan SM, Karaca C. The effect of cold ischemia time on delayed graft function and acute rejection in kidney transplantation. *Saudi journal of kidney diseases and transplantation : an official publication of the Saudi Center for Organ Transplantation, Saudi Arabia* 2014, **25**(5)**:** 960-966.
74. Perez Valdivia MA, Gentil MA, Toro M, Cabello M, Rodriguez-Benot A, Mazuecos A*, et al.* Impact of cold ischemia time on initial graft function and survival rates in renal transplants

from deceased donors performed in Andalusia. *Transplantation proceedings* 2011, **43**(6)**:** 2174-2176.
75. Ounissi M, Cherif M, Abdallah TB, Bacha M, Hedri H, Abderrahim E*, et al.* Risk factors and consequences of delayed graft function. *Saudi journal of kidney diseases and transplantation : an official publication of the Saudi Center for Organ Transplantation, Saudi Arabia* 2013, **24**(2)**:** 243-246.
76. Teoh N, Dela Pena A, Farrell G. Hepatic ischemic preconditioning in mice is associated with activation of NF-kappaB, p38 kinase, and cell cycle entry. *Hepatology* 2002, **36**(1)**:** 94-102.
77. Morris SF, Pang CY, Zhong A, Boyd B, Forrest CR. Assessment of ischemia-induced reperfusion injury in the pig latissimus dorsi myocutaneous flap model. *Plast Reconstr Surg* 1993, **92**(6)**:** 1162-1172.
78. Carroll WR, Esclamado RM. Ischemia/reperfusion injury in microvascular surgery. *Head Neck* 2000, **22**(7)**:** 700-713.
79. Buja LM. Myocardial ischemia and reperfusion injury. *Cardiovasc Pathol* 2005, **14**(4)**:** 170-175.
80. Hossmann KA. Pathophysiology and therapy of experimental stroke. *Cell Mol Neurobiol* 2006, **26**(7-8)**:** 1057-1083.
81. Mergenthaler P, Dirnagl U, Meisel A. Pathophysiology of stroke: lessons from animal models. *Metab Brain Dis* 2004, **19**(3-4)**:** 151-167.
82. Rauen U, de Groot H. New insights into the cellular and molecular mechanisms of cold storage injury. *J Investig Med* 2004, **52**(5)**:** 299-309.
83. de Groot H, Rauen U. Ischemia-reperfusion injury: processes in pathogenetic networks: a review. *Transplantation proceedings* 2007, **39**(2)**:** 481-484.
84. Eltzschig HK, Carmeliet P. Hypoxia and inflammation. *N Engl J Med* 2011, **364**(7)**:** 656-665.
85. Fong GH, Takeda K. Role and regulation of prolyl hydroxylase domain proteins. *Cell death and differentiation* 2008, **15**(4)**:** 635-641.
86. Carroll MC, Holers VM. Innate autoimmunity. *Adv Immunol* 2005, **86:** 137-157.
87. Kaminski KA, Bonda TA, Korecki J, Musial WJ. Oxidative stress and neutrophil activation--the two keystones of ischemia/reperfusion injury. *Int J Cardiol* 2002, **86**(1)**:** 41-59.
88. Zweier JL, Talukder MA. The role of oxidants and free radicals in reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 2006, **70**(2)**:** 181-190.
89. Granger DN. Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol* 1988, **255**(6 Pt 2)**:** H1269-1275.
90. Tyler DD. Polarographic assay and intracellular distribution of superoxide dismutase in rat liver. *Biochem J* 1975, **147**(3)**:** 493-504.
91. Packer MA, Porteous CM, Murphy MP. Superoxide production by mitochondria in the presence of nitric oxide forms peroxynitrite. *Biochem Mol Biol Int* 1996, **40**(3)**:** 527-534.
92. Halliwell B, Gutteridge JM, Cross CE. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? *J Lab Clin Med* 1992, **119**(6)**:** 598-620.
93. Anaya-Prado R, Toledo-Pereyra LH, Lentsch AB, Ward PA. Ischemia/reperfusion injury. *J Surg Res* 2002, **105**(2)**:** 248-258.
94. Maier CM, Chan PH. Role of superoxide dismutases in oxidative damage and neurodegenerative disorders. *Neuroscientist* 2002, **8**(4)**:** 323-334.
95. Chen GY, Nunez G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nature reviews Immunology* 2010, **10**(12)**:** 826-837.
96. Iadecola C, Anrather J. The immunology of stroke: from mechanisms to translation. *Nat Med* 2011, **17**(7)**:** 796-808.
97. Chen GY, Nunez G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nature reviews Immunology*, **10**(12)**:** 826-837.
98. Iyer SS, Pulskens WP, Sadler JJ, Butter LM, Teske GJ, Ulland TK*, et al.* Necrotic cells trigger a sterile inflammatory response through the Nlrp3 inflammasome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2009, **106**(48)**:** 20388-20393.

99. McDonald B, Pittman K, Menezes GB, Hirota SA, Slaba I, Waterhouse CC*, et al.* Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of sterile inflammation. *Science*, **330**(6002)**:** 362-366.
100. SPRinger TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 1994, **76**(2)**:** 301-314.
101. Grisham MB, Granger DN, Lefer DJ. Modulation of leukocyte-endothelial interactions by reactive metabolites of oxygen and nitrogen: relevance to ischemic heart disease. *Free Radic Biol Med* 1998, **25**(4-5)**:** 404-433.
102. Schall TJ, Bacon KB. Chemokines, leukocyte trafficking, and inflammation. *Curr Opin Immunol* 1994, **6**(6)**:** 865-873.
103. Butcher EC. Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell* 1991, **67**(6)**:** 1033-1036.
104. Hehlgans T, Pfeffer K. The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology* 2005, **115**(1)**:** 1-20.
105. Dinarello CA. Interleukin-1beta. *Crit Care Med* 2005, **33**(12 Suppl)**:** S460-462.
106. Johnston B, Butcher EC. Chemokines in rapid leukocyte adhesion triggering and migration. *Semin Immunol* 2002, **14**(2)**:** 83-92.
107. Sallusto F, Mackay CR. Chemoattractants and their receptors in homeostasis and inflammation. *Curr Opin Immunol* 2004, **16**(6)**:** 724-731.
108. McEver RP. Selectins: lectins that initiate cell adhesion under flow. *Curr Opin Cell Biol* 2002, **14**(5)**:** 581-586.
109. Sperandio M. Selectins and glycosyltransferases in leukocyte rolling in vivo. *FEBS J* 2006, **273**(19)**:** 4377-4389.
110. Kreisel D, Sugimoto S, Tietjens J, Zhu J, Yamamoto S, Krupnick AS*, et al.* Bcl3 prevents acute inflammatory lung injury in mice by restraining emergency granulopoiesis. *J Clin Invest*, **121**(1)**:** 265-276.
111. Carden DL, Smith JK, Korthuis RJ. Neutrophil-mediated microvascular dysfunction in postischemic canine skeletal muscle. Role of granulocyte adherence. *Circ Res* 1990, **66**(5)**:** 1436-1444.
112. Weiss SJ. Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med* 1989, **320**(6)**:** 365-376.
113. Bagge U, Amundson B, Lauritzen C. White blood cell deformability and plugging of skeletal muscle capillaries in hemorrhagic shock. *Acta Physiol Scand* 1980, **108**(2)**:** 159-163.
114. Jassem W, Fuggle SV, Rela M, Koo DD, Heaton ND. The role of mitochondria in ischemia/reperfusion injury. *Transplantation* 2002, **73**(4)**:** 493-499.
115. Bamboat ZM, Ocuin LM, Balachandran VP, Obaid H, Plitas G, DeMatteo RP. Conventional DCs reduce liver ischemia/reperfusion injury in mice via IL-10 secretion. *J Clin Invest*, **120**(2)**:** 559-569.
116. Schroeter M, Jander S, Witte OW, Stoll G. Local immune responses in the rat cerebral cortex after middle cerebral artery occlusion. *J Neuroimmunol* 1994, **55**(2)**:** 195-203.
117. Yilmaz G, Arumugam TV, Stokes KY, Granger DN. Role of T lymphocytes and interferon-gamma in ischemic stroke. *Circulation* 2006, **113**(17)**:** 2105-2112.
118. Yang Z, Day YJ, Toufektsian MC, Ramos SI, Marshall M, Wang XQ*, et al.* Infarct-sparing effect of A2A-adenosine receptor activation is due primarily to its action on lymphocytes. *Circulation* 2005, **111**(17)**:** 2190-2197.
119. Day YJ, Huang L, Ye H, Li L, Linden J, Okusa MD. Renal ischemia-reperfusion injury and adenosine 2A receptor-mediated tissue protection: the role of CD4+ T cells and IFN-gamma. *Journal of immunology* 2006, **176**(5)**:** 3108-3114.
120. Shichita T, Sugiyama Y, Ooboshi H, Sugimori H, Nakagawa R, Takada I*, et al.* Pivotal role of cerebral interleukin-17-producing gammadeltaT cells in the delayed phase of ischemic brain injury. *Nat Med* 2009, **15**(8)**:** 946-950.
121. Li GZ, Zhong D, Yang LM, Sun B, Zhong ZH, Yin YH*, et al.* Expression of interleukin-17 in ischemic brain tissue. *Scand J Immunol* 2005, **62**(5)**:** 481-486.
122. Satpute SR, Park JM, Jang HR, Agreda P, Liu M, Gandolfo MT*, et al.* The role for T cell repertoire/antigen-specific interactions in experimental kidney ischemia reperfusion injury. *Journal of immunology* 2009, **183**(2)**:** 984-992.

123. Shen X, Wang Y, Gao F, Ren F, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW*, et al.* CD4 T cells promote tissue inflammation via CD40 signaling without de novo activation in a murine model of liver ischemia/reperfusion injury. *Hepatology* 2009, **50**(5)**:** 1537-1546.
124. Takada M, Chandraker A, Nadeau KC, Sayegh MH, Tilney NL. The role of the B7 costimulatory pathway in experimental cold ischemia/reperfusion injury. *J Clin Invest* 1997, **100**(5)**:** 1199-1203.
125. Ishikawa M, Vowinkel T, Stokes KY, Arumugam TV, Yilmaz G, Nanda A*, et al.* CD40/CD40 ligand signaling in mouse cerebral microvasculature after focal ischemia/reperfusion. *Circulation* 2005, **111**(13)**:** 1690-1696.
126. Liesz A, Suri-Payer E, Veltkamp C, Doerr H, Sommer C, Rivest S*, et al.* Regulatory T cells are key cerebroprotective immunomodulators in acute experimental stroke. *Nat Med* 2009, **15**(2)**:** 192-199.
127. Groth A, Vrugt B, Brock M, Speich R, Ulrich S, Huber LC. Inflammatory cytokines in pulmonary hypertension. *Respiratory research* 2014, **15:** 47.
128. Siniscalchi A, Gamberini L, Laici C, Bardi T, Ercolani G, Lorenzini L*, et al.* Post reperfusion syndrome during liver transplantation: From pathophysiology to therapy and preventive strategies. *World journal of gastroenterology* 2016, **22**(4)**:** 1551-1569.
129. Paugam-Burtz C, Kavafyan J, Merckx P, Dahmani S, Sommacale D, Ramsay M*, et al.* Postreperfusion syndrome during liver transplantation for cirrhosis: outcome and predictors. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society* 2009, **15**(5)**:** 522-529.
130. Yarlagadda SG, Coca SG, Garg AX, Doshi M, Poggio E, Marcus RJ*, et al.* Marked variation in the definition and diagnosis of delayed graft function: a systematic review. *Nephrol Dial Transplant* 2008, **23**(9)**:** 2995-3003.
131. Chen Hao XJ, Shen Baiyong, Deng Xiaxing, Tao Ran, Peng Chenghong and Li Hongwei. Initial Poor Graft Dysfunction and Primary Graft Non-Function After Orthotopic Liver Transplantation. *Liver Biopsy in Modern Medicine* 2011.
132. Sirivatanauksorn Y, Taweerutchana V, Limsrichamrern S, Kositamongkol P, Mahawithitwong P, Asavakarn S*, et al.* Recipient and perioperative risk factors associated with liver transplant graft outcomes. *Transplantation proceedings* 2012, **44**(2)**:** 505-508.
133. Stahl JE, Kreke JE, Malek FA, Schaefer AJ, Vacanti J. Consequences of cold-ischemia time on primary nonfunction and patient and graft survival in liver transplantation: a meta-analysis. *PloS one* 2008, **3**(6)**:** e2468.
134. Piratvisuth T, Tredger JM, Hayllar KA, Williams R. Contribution of true cold and rewarming ischemia times to factors determining outcome after orthotopic liver transplantation. *Liver transplantation and surgery : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society* 1995, **1**(5)**:** 296-301.
135. Yarlagadda SG, Coca SG, Formica RN, Jr., Poggio ED, Parikh CR. Association between delayed graft function and allograft and patient survival: a systematic review and meta-analysis. *Nephrol Dial Transplant* 2009, **24**(3)**:** 1039-1047.
136. Zeraati AA, Naghibi M, Kianoush S, Ashraf H. Impact of slow and delayed graft function on kidney graft survival between various subgroups among renal transplant patients. *Transplantation proceedings* 2009, **41**(7)**:** 2777-2780.
137. Perico N, Cattaneo D, Sayegh MH, Remuzzi G. Delayed graft function in kidney transplantation. *Lancet* 2004, **364**(9447)**:** 1814-1827.
138. Kim BS, Lim SW, Li C, Kim JS, Sun BK, Ahn KO*, et al.* Ischemia-reperfusion injury activates innate immunity in rat kidneys. *Transplantation* 2005, **79**(10)**:** 1370-1377.
139. Liano F, Pascual J. Epidemiology of acute renal failure: a prospective, multicenter, community-based study. Madrid Acute Renal Failure Study Group. *Kidney international* 1996, **50**(3)**:** 811-818.
140. Ojo AO, Wolfe RA, Held PJ, Port FK, Schmouder RL. Delayed graft function: risk factors and implications for renal allograft survival. *Transplantation* 1997, **63**(7)**:** 968-974.
141. Totsuka E, Fung JJ, Lee MC, Ishii T, Umehara M, Makino Y*, et al.* Influence of cold ischemia time and graft transport distance on postoperative outcome in human liver transplantation. *Surgery today* 2002, **32**(9)**:** 792-799.

142. Carmellini M, Vistoli F, Boggi U, Bellini R, Mosca F. Delayed graft function incidence as predictive variable of survival of kidney grafts retrieved from elderly donors. *Transplantation proceedings* 2000, **32**(1)**:** 128-130.
143. Rubén Schiavelli JR, Daniel Di Tullio, Agustina Gautos, Roberto Sabbatiello, Mauricio Pattin, Miguel Raño. RETRASO DE LA FUNCIÓN DEL INJERTO EN TRASPLANTE RENAL. *Nefrología, Diálisis y Trasplante* 2015, **35**(4)**:** 182- 187.
144. Deschenes M, Belle SH, Krom RA, Zetterman RK, Lake JR. Early allograft dysfunction after liver transplantation: a definition and predictors of outcome. National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases Liver Transplantation Database. *Transplantation* 1998, **66**(3)**:** 302-310.
145. Hoyer DP, Paul A, Gallinat A, Molmenti EP, Reinhardt R, Minor T*, et al.* Donor information based prediction of early allograft dysfunction and outcome in liver transplantation. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* 2015, **35**(1)**:** 156-163.
146. Chen XB, Xu MQ. Primary graft dysfunction after liver transplantation. *Hepatobiliary & pancreatic diseases international : HBPD INT* 2014, **13**(2)**:** 125-137.
147. Pokorny H, Gruenberger T, Soliman T, Rockenschaub S, Langle F, Steininger R. Organ survival after primary dysfunction of liver grafts in clinical orthotopic liver transplantation. *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation* 2000, **13 Suppl 1:** S154-157.
148. Novelli G, Rossi M, Poli L, Morabito V, Bussotti A, Pugliese F*, et al.* Primary nonfunction: timing retransplantation versus hemodynamic parameters and kidney function. *Transplantation proceedings* 2008, **40**(6)**:** 1854-1857.
149. Olthoff KM, Kulik L, Samstein B, Kaminski M, Abecassis M, Emond J*, et al.* Validation of a current definition of early allograft dysfunction in liver transplant recipients and analysis of risk factors. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society* 2010, **16**(8)**:** 943-949.
150. Gonzalez FX, Rimola A, Grande L, Antolin M, Garcia-Valdecasas JC, Fuster J*, et al.* Predictive factors of early postoperative graft function in human liver transplantation. *Hepatology* 1994, **20**(3)**:** 565-573.
151. Uemura T, Randall HB, Sanchez EQ, Ikegami T, Narasimhan G, McKenna GJ*, et al.* Liver retransplantation for primary nonfunction: analysis of a 20-year single-center experience. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society* 2007, **13**(2)**:** 227-233.
152. Wiesner RH, Batts KP, Krom RA. Evolving concepts in the diagnosis, pathogenesis, and treatment of chronic hepatic allograft rejection. *Liver transplantation and surgery : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society* 1999, **5**(5)**:** 388-400.
153. Marsden PA. Predicting outcomes after renal transplantation--new tools and old tools. *The New England journal of medicine* 2003, **349**(2)**:** 182-184.
154. Maathuis MH, Leuvenink HG, Ploeg RJ. Perspectives in organ preservation. *Transplantation* 2007, **83**(10)**:** 1289-1298.
155. Ploeg RJ, van Bockel JH, Langendijk PT, Groenewegen M, van der Woude FJ, Persijn GG*, et al.* Effect of preservation solution on results of cadaveric kidney transplantation. The European Multicentre Study Group. *Lancet* 1992, **340**(8812)**:** 129-137.
156. St Peter SD, Imber CJ, Friend PJ. Liver and kidney preservation by perfusion. *Lancet* 2002, **359**(9306)**:** 604-613.
157. Polyak MM, Arrington BO, Stubenbord WT, Boykin J, Brown T, Jean-Jacques MA*, et al.* The influence of pulsatile preservation on renal transplantation in the 1990s. *Transplantation* 2000, **69**(2)**:** 249-258.
158. Kayawake S, Narbaitz R, Kako KJ. Effects of chloroquine and Nifedipine on the phospholipid content and enzyme activity in the subcellular fraction of ischemic rat liver. *Basic research in cardiology* 1982, **77**(2)**:** 140-157.

159. Farber JL, Martin JT, Chien KR. Irreversible ischemic cell injury. Prevention by chlorpromazine of the aggregation of the intramembranous particles of rat liver plasma membranes. *The American journal of pathology* 1978, **92**(3)**:** 713-732.
160. Singbartl K, Ley K. Protection from ischemia-reperfusion induced severe acute renal failure by blocking E-selectin. *Crit Care Med* 2000, **28**(7)**:** 2507-2514.
161. Raafat AM, Murray MT, McGuire T, DeFrain M, Franko AP, Zafar RS*, et al.* Calcium blockade reduces renal apoptosis during ischemia reperfusion. *Shock* 1997, **8**(3)**:** 186-192.
162. Soltys K, Dikdan G, Koneru B. Oxidative stress in fatty livers of obese Zucker rats: rapid amelioration and improved tolerance to warm ischemia with tocopherol. *Hepatology* 2001, **34**(1)**:** 13-18.
163. Nakano H, Boudjema K, Alexandre E, Imbs P, Chenard MP, Wolf P*, et al.* Protective effects of N-acetylcysteine on hypothermic ischemia-reperfusion injury of rat liver. *Hepatology* 1995, **22**(2)**:** 539-545.
164. Cuzzocrea S, Mazzon E, Costantino G, Serraino I, De Sarro A, Caputi AP. Effects of n-acetylcysteine in a rat model of ischemia and reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 2000, **47**(3)**:** 537-548.
165. DiMari J, Megyesi J, Udvarhelyi N, Price P, Davis R, Safirstein R. N-acetyl cysteine ameliorates ischemic renal failure. *Am J Physiol* 1997, **272**(3 Pt 2)**:** F292-298.
166. Sun Y, Pu LY, Lu L, Wang XH, Zhang F, Rao JH. N-acetylcysteine attenuates reactive-oxygen-species-mediated endoplasmic reticulum stress during liver ischemia-reperfusion injury. *World journal of gastroenterology* 2014, **20**(41)**:** 15289-15298.
167. Yurdakul T, Kulaksizoglu H, Piskin MM, Avunduk MC, Ertemli E, Gokce G*, et al.* Combination antioxidant effect of alpha-tocoferol and erdosteine in ischemia-reperfusion injury in rat model. *International urology and nephrology* 2010, **42**(3)**:** 647-655.
168. Takenaka M, Tatsukawa Y, Dohi K, Ezaki H, Matsukawa K, Kawasaki T. Protective effects of alpha-tocopherol and coenzyme Q10 on warm ischemic damages of the rat kidney. *Transplantation* 1981, **32**(2)**:** 137-141.
169. Wollin SD, Jones PJ. Alpha-lipoic acid and cardiovascular disease. *The Journal of nutrition* 2003, **133**(11)**:** 3327-3330.
170. Whiteman M, Tritschler H, Halliwell B. Protection against peroxynitrite-dependent tyrosine nitration and alpha 1-antiproteinase inactivation by oxidized and reduced lipoic acid. *FEBS letters* 1996, **379**(1)**:** 74-76.
171. Packer L. alpha-Lipoic acid: a metabolic antioxidant which regulates NF-kappa B signal transduction and protects against oxidative injury. *Drug metabolism reviews* 1998, **30**(2)**:** 245-275.
172. Shay KP, Moreau RF, Smith EJ, Smith AR, Hagen TM. Alpha-lipoic acid as a dietary supplement: molecular mechanisms and therapeutic potential. *Biochimica et biophysica acta* 2009, **1790**(10)**:** 1149-1160.
173. Reed LJ. From lipoic acid to multi-enzyme complexes. *Protein science : a publication of the Protein Society* 1998, **7**(1)**:** 220-224.
174. Bilska A, Wlodek L. Lipoic acid - the drug of the future? *Pharmacological reports : PR* 2005, **57**(5)**:** 570-577.
175. Lee HA, Hughes DA. Alpha-lipoic acid modulates NF-kappaB activity in human monocytic cells by direct interaction with DNA. *Experimental gerontology* 2002, **37**(2-3)**:** 401-410.
176. Dulundu E, Ozel Y, Topaloglu U, Sehirli O, Ercan F, Gedik N*, et al.* Alpha-lipoic acid protects against hepatic ischemia-reperfusion injury in rats. *Pharmacology* 2007, **79**(3)**:** 163-170.
177. Abdin AA, El-Hamid MA, El-Seoud SH, Balaha MF. Effect of pentoxifylline and/or alpha lipoic acid on experimentally induced acute pancreatitis. *Eur J Pharmacol* 2010, **643**(2-3)**:** 289-296.
178. Bae EH, Lee KS, Lee J, Ma SK, Kim NH, Choi KC*, et al.* Effects of alpha-lipoic acid on ischemia-reperfusion-induced renal dysfunction in rats. *American journal of physiology Renal physiology* 2008, **294**(1)**:** F272-280.
179. Sehirli O, Sener E, Cetinel S, Yuksel M, Gedik N, Sener G. Alpha-lipoic acid protects against renal ischaemia-reperfusion injury in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2008, **35**(3)**:** 249-255.

180. Takaoka M, Ohkita M, Kobayashi Y, Yuba M, Matsumura Y. Protective effect of alpha-lipoic acid against ischaemic acute renal failure in rats. *Clinical and experimental pharmacology & physiology* 2002, **29**(3)**:** 189-194.
181. Teichert J, Kern J, Tritschler HJ, Ulrich H, Preiss R. Investigations on the pharmacokinetics of alpha-lipoic acid in healthy volunteers. *International journal of clinical pharmacology and therapeutics* 1998, **36**(12)**:** 625-628.
182. Dunschede F, Erbes K, Kircher A, Westermann S, Seifert J, Schad A*, et al.* Reduction of ischemia reperfusion injury after liver resection and hepatic inflow occlusion by alpha-lipoic acid in humans. *World journal of gastroenterology* 2006, **12**(42)**:** 6812-6817.
183. Papanas N, Ziegler D. Efficacy of alpha-lipoic acid in diabetic neuropathy. *Expert Opin Pharmacother* 2014, **15**(18)**:** 2721-2731.
184. Heffron T, Welch D, Pillen T, Asolati M, Smallwood G, Hagedorn P*, et al.* Successful ABO-incompatible pediatric liver transplantation utilizing standard immunosuppression with selective postoperative plasmapheresis. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society* 2006, **12**(6)**:** 972-978.
185. Raut V, Mori A, Kaido T, Ogura Y, Taku I, Nagai K*, et al.* Splenectomy does not offer immunological benefits in ABO-incompatible liver transplantation with a preoperative rituximab. *Transplantation* 2012, **93**(1)**:** 99-105.
186. Srinivas Reddy M, Wilson C, Torpey N, Manas DM. ABO incompatible liver transplantation: a case of immediate need. *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation* 2007, **20**(10)**:** 904-905.
187. Mendes M, Ferreira AC, Ferreira A, Remedio F, Aires I, Cordeiro A*, et al.* ABO-incompatible liver transplantation in acute liver failure: a single Portuguese center study. *Transplantation proceedings* 2013, **45**(3)**:** 1110-1115.
188. Melexopoulou C, Marinaki S, Liapis G, Skalioti C, Gavalaki M, Zavos G*, et al.* Excellent long term patient and renal allograft survival after ABO-incompatible kidney transplantation: Experience of one center. *World journal of transplantation* 2015, **5**(4)**:** 329-337.
189. Hatakeyama S, Fujita T, Murakami R, Suzuki Y, Sugiyama N, Yamamoto H*, et al.* Outcome comparison of ABO-incompatible kidney transplantation with low-dose rituximab and ABO-compatible kidney transplantation: a single-center experience. *Transplantation proceedings* 2014, **46**(2)**:** 445-448.
190. Jha PK, Bansal SB, Sethi SK, Jain M, Sharma R, Nandwani A*, et al.* ABO-incompatible renal transplantation in developing world - crossing the immunological (and mental) barrier. *Indian journal of nephrology* 2016, **26**(2)**:** 113-118.
191. Ortega F. Trasplante renal. Panamericana; 2007.
192. Auphan N, DiDonato JA, Rosette C, Helmberg A, Karin M. Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappa B activity through induction of I kappa B synthesis. *Science* 1995, **270**(5234)**:** 286-290.
193. Karam S, Wali RK. Current State of Immunosuppression: Past, Present, and Future. *Critical reviews in eukaryotic gene expression* 2015, **25**(2)**:** 113-134.
194. Bertrand D, Cheddani L, Guerrot D. Belatacept and Long-Term Outcomes in Kidney Transplantation. *The New England journal of medicine* 2016, **374**(26)**:** 2599.
195. Solez K, Colvin RB, Racusen LC, Sis B, Halloran PF, Birk PE*, et al.* Banff '05 Meeting Report: differential diagnosis of chronic allograft injury and elimination of chronic allograft nephropathy ('CAN'). *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 2007, **7**(3)**:** 518-526.
196. Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL, O'Connell PJ, Chapman JR, Allen RD. Calcineurin inhibitor nephrotoxicity: longitudinal assessment by protocol histology. *Transplantation* 2004, **78**(4)**:** 557-565.
197. Stallone G, Infante B, Schena A, Battaglia M, Ditonno P, Loverre A*, et al.* Rapamycin for treatment of chronic allograft nephropathy in renal transplant patients. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2005, **16**(12)**:** 3755-3762.

198. Abramowicz D, Del Carmen Rial M, Vitko S, del Castillo D, Manas D, Lao M*, et al.* Cyclosporine withdrawal from a mycophenolate mofetil-containing immunosuppressive regimen: results of a five-year, prospective, randomized study. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2005, **16**(7)**:** 2234-2240.
199. Meier-Kriesche HU, Schold JD, Srinivas TR, Kaplan B. Lack of improvement in renal allograft survival despite a marked decrease in acute rejection rates over the most recent era. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 2004, **4**(3)**:** 378-383.
200. Lamb KE, Lodhi S, Meier-Kriesche HU. Long-term renal allograft survival in the United States: a critical reappraisal. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 2011, **11**(3)**:** 450-462.
201. Vasconcellos LM, Schachter AD, Zheng XX, Vasconcellos LH, Shapiro M, Harmon WE*, et al.* Cytotoxic lymphocyte gene expression in peripheral blood leukocytes correlates with rejecting renal allografts. *Transplantation* 1998, **66**(5)**:** 562-566.
202. Renesto PG, Ponciano VC, Cenedeze MA, Saraiva Camara NO, Pacheco-Silva A. High expression of Tim-3 mRNA in urinary cells from kidney transplant recipients with acute rejection. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 2007, **7**(6)**:** 1661-1665.
203. Sui W, Dai Y, Huang Y, Lan H, Yan Q, Huang H. Microarray analysis of MicroRNA expression in acute rejection after renal transplantation. *Transplant immunology* 2008, **19**(1)**:** 81-85.
204. Wang Z, Liu X, Lu P, Han Z, Tao J, Wang J*, et al.* Performance of the ImmuKnow assay in differentiating infection and acute rejection after kidney transplantation: a meta-analysis. *Transplantation proceedings* 2014, **46**(10)**:** 3343-3351.
205. Muller C, Dunschede F, Koch E, Vollmar AM, Kiemer AK. Alpha-lipoic acid preconditioning reduces ischemia-reperfusion injury of the rat liver via the PI3-kinase/Akt pathway. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* 2003, **285**(4)**:** G769-778.
206. Maffia PC, Zittermann SE, Scimone ML, Tateosian N, Amiano N, Guerrieri D*, et al.* Neutrophil elastase converts human immature dendritic cells into transforming growth factor-beta1-secreting cells and reduces allostimulatory ability. *The American journal of pathology* 2007, **171**(3)**:** 928-937.
207. Siedlecki A, Irish W, Brennan DC. Delayed graft function in the kidney transplant. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 2011, **11**(11)**:** 2279-2296.
208. Iovanna JL, Keim V, Nordback I, Montalto G, Camarena J, Letoublon C*, et al.* Serum levels of pancreatitis-associated protein as indicators of the course of acute pancreatitis. Multicentric Study Group on Acute Pancreatitis. *Gastroenterology* 1994, **106**(3)**:** 728-734.
209. Guazzone VA, Guerrieri D, Jacobo P, Glisoni RJ, Chiappetta D, Lustig L*, et al.* Micro-encapsulated secretory leukocyte protease inhibitor decreases cell-mediated immune response in autoimmune orchitis. *Life sciences* 2011, **89**(3-4)**:** 100-106.
210. Bergenfeldt M, Bjork P, Ohlsson K. The elimination of secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) after intravenous injection in dog and man. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation* 1990, **50**(7)**:** 729-737.
211. Tateosian NL, Pasquinelli V, Hernandez Del Pino RE, Ambrosi N, Guerrieri D, Pedraza-Sanchez S*, et al.* The impact of IFN-gamma receptor on SLPI expression in active tuberculosis: association with disease severity. *The American journal of pathology* 2014, **184**(5)**:** 1268-1273.
212. Odaka C, Mizuochi T, Yang J, Ding A. Murine macrophages produce secretory leukocyte protease inhibitor during clearance of apoptotic cells: implications for resolution of the inflammatory response. *Journal of immunology* 2003, **171**(3)**:** 1507-1514.
213. Trinchieri G. Type I interferon: friend or foe? *The Journal of experimental medicine* 2010, **207**(10)**:** 2053-2063.

214. Platanias LC. Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nature reviews Immunology* 2005, **5**(5)**:** 375-386.
215. Dinarello CA. A clinical perspective of IL-1beta as the gatekeeper of inflammation. *European journal of immunology* 2011, **41**(5)**:** 1203-1217.
216. Regateiro FS, Howie D, Cobbold SP, Waldmann H. TGF-beta in transplantation tolerance. *Current opinion in immunology* 2011, **23**(5)**:** 660-669.
217. Yoshimura A, Muto G. TGF-beta function in immune suppression. *Current topics in microbiology and immunology* 2011, **350:** 127-147.
218. Lacha J, Hribova P, Kotsch K, Brabcova I, Bartosova K, Volk HD*, et al.* Effect of cytokines and chemokines (TGF-beta, TNF-alpha, IL-6, IL-10, MCP-1, RANTES) gene polymorphisms in kidney recipients on posttransplantation outcome: influence of donor-recipient match. *Transplantation proceedings* 2005, **37**(2)**:** 764-766.
219. Soares MP, Marguti I, Cunha A, Larsen R. Immunoregulatory effects of HO-1: how does it work? *Current opinion in pharmacology* 2009, **9**(4)**:** 482-489.
220. Koliaraki V, Kollias G. A new role for myeloid HO-1 in the innate to adaptive crosstalk and immune homeostasis. *Advances in experimental medicine and biology* 2011, **780:** 101-111.
221. Camara NO, Soares MP. Heme oxygenase-1 (HO-1), a protective gene that prevents chronic graft dysfunction. *Free radical biology & medicine* 2005, **38**(4)**:** 426-435.
222. Takahashi T, Morita K, Akagi R, Sassa S. Protective role of heme oxygenase-1 in renal ischemia. *Antioxidants & redox signaling* 2004, **6**(5)**:** 867-877.
223. Boletis J, Balitsari A, Filiopoulos V, Stamataki E, Lionaki S, Zavos G*, et al.* Delayed renal graft function: the influence of immunosuppression. *Transplantation proceedings* 2005, **37**(5)**:** 2054-2059.
224. Freitas MC, Uchida Y, Lassman C, Danovitch GM, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW. Type I interferon pathway mediates renal ischemia/reperfusion injury. *Transplantation* 2011, **92**(2)**:** 131-138.
225. Ptilovanciv EO, Fernandes GS, Teixeira LC, Reis LA, Pessoa EA, Convento MB*, et al.* Heme oxygenase 1 improves glucoses metabolism and kidney histological alterations in diabetic rats. *Diabetology & metabolic syndrome* 2013, **5**(1)**:** 3.
226. Terasaki PI, Gjertson DW, Cecka JM, Takemoto S, Cho YW. Significance of the donor age effect on kidney transplants. *Clinical transplantation* 1997, **11**(5 Pt 1)**:** 366-372.
227. Weissenbacher A, Jara M, Ulmer H, Biebl M, Bosmuller C, Schneeberger S*, et al.* Recipient and donor body mass index as important risk factors for delayed kidney graft function. *Transplantation* 2012, **93**(5)**:** 524-529.
228. Zens T LG, Redfield R, Chlebeck P, Zitur L, Kaufman D, Fernandez L. [abstract] The Impact of Kidney Donor Profile Index (KDPI) on Rates of Delayed Graft Function (DGF). . *Am J Transplant* 2016, **16** ((suppl 3).).
229. Gandolfini I, Buzio C, Zanelli P, Palmisano A, Cremaschi E, Vaglio A*, et al.* The Kidney Donor Profile Index (KDPI) of marginal donors allocated by standardized pretransplant donor biopsy assessment: distribution and association with graft outcomes. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 2014, **14**(11)**:** 2515-2525.
230. Malyszko J, Lukaszyk E, Glowinska I, Durlik M. Biomarkers of delayed graft function as a form of acute kidney injury in kidney transplantation. *Scientific reports* 2015, **5:** 11684.
231. Coulthard LG, Woodruff TM. Is the complement activation product C3a a proinflammatory molecule? Re-evaluating the evidence and the myth. *Journal of immunology* 2015, **194**(8)**:** 3542-3548.
232. Correa-Costa M, Amano MT, Camara NO. Cytoprotection behind heme oxygenase-1 in renal diseases. *World journal of nephrology* 2012, **1**(1)**:** 4-11.
233. von Dobschuetz E, Schmidt R, Scholtes M, Thomusch O, Schwer CI, Geiger KK*, et al.* Protective role of heme oxygenase-1 in pancreatic microcirculatory dysfunction after ischemia/reperfusion in rats. *Pancreas* 2008, **36**(4)**:** 377-384.
234. Schwer CI, Guerrero AM, Humar M, Roesslein M, Goebel U, Stoll P*, et al.* Heme oxygenase-1 inhibits the proliferation of pancreatic stellate cells by repression of the extracellular signal-regulated kinase1/2 pathway. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 2008, **327**(3)**:** 863-871.

235. Schnuelle P, Lorenz D, Mueller A, Trede M, Van Der Woude FJ. Donor catecholamine use reduces acute allograft rejection and improves graft survival after cadaveric renal transplantation. *Kidney international* 1999, **56**(2)**:** 738-746.
236. Schnuelle P, Berger S, de Boer J, Persijn G, van der Woude FJ. Effects of catecholamine application to brain-dead donors on graft survival in solid organ transplantation. *Transplantation* 2001, **72**(3)**:** 455-463.
237. Kuecuek O, Mantouvalou L, Klemz R, Kotsch K, Volk HD, Jonas S*, et al.* Significant reduction of proinflammatory cytokines by treatment of the brain-dead donor. *Transplantation proceedings* 2005, **37**(1)**:** 387-388.
238. Uyar IS, Onal S, Akpinar MB, Gonen I, Sahin V, Uguz AC*, et al.* Alpha lipoic acid attenuates inflammatory response during extracorporeal circulation. *Cardiovascular journal of Africa* 2013, **24**(8)**:** 322-326.
239. Keim V, Iovanna JL, Orelle B, Verdier JM, Busing M, Hopt U*, et al.* A novel exocrine protein associated with pancreas transplantation in humans. *Gastroenterology* 1992, **103**(1)**:** 248-254.
240. Orelle B, Keim V, Masciotra L, Dagorn JC, Iovanna JL. Human pancreatitis-associated protein. Messenger RNA cloning and expression in pancreatic diseases. *The Journal of clinical investigation* 1992, **90**(6)**:** 2284-2291.
241. van der Pijl JW, Boonstra JG, Barthellemy S, Smets YF, Hermans J, Bruijn JA*, et al.* Pancreatitis-associated protein: a putative marker for pancreas graft rejection. *Transplantation* 1997, **63**(7)**:** 995-1003.
242. Schneider M, Van Geyte K, Fraisl P, Kiss J, Aragones J, Mazzone M*, et al.* Loss or silencing of the PHD1 prolyl hydroxylase protects livers of mice against ischemia/reperfusion injury. *Gastroenterology* 2010, **138**(3)**:** 1143-1154 e1141-1142.
243. Christa L, Simon MT, Brezault-Bonnet C, Bonte E, Carnot F, Zylberberg H*, et al.* Hepatocarcinoma-intestine-pancreas/pancreatic associated protein (HIP/PAP) is expressed and secreted by proliferating ductules as well as by hepatocarcinoma and cholangiocarcinoma cells. *The American journal of pathology* 1999, **155**(5)**:** 1525-1533.
244. Bukowicka B, Akar RA, Olszewska A, Smoter P, Krawczyk M. The occurrence of postreperfusion syndrome in orthotopic liver transplantation and its significance in terms of complications and short-term survival. *Annals of transplantation* 2011, **16**(2)**:** 26-30.
245. Chui AK, Shi L, Tanaka K, Rao AR, Wang LS, Bookallil M*, et al.* Postreperfusion syndrome in orthotopic liver transplantation. *Transplantation proceedings* 2000, **32**(7)**:** 2116-2117.
246. Ryu HG, Jung CW, Lee HC, Cho YJ. Epinephrine and phenylephrine pretreatments for preventing postreperfusion syndrome during adult liver transplantation. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society* 2012, **18**(12)**:** 1430-1439.
247. Xu ZD, Xu HT, Yuan HB, Zhang H, Ji RH, Zou Z*, et al.* Postreperfusion syndrome during orthotopic liver transplantation: a single-center experience. *Hepatobiliary & pancreatic diseases international : HBPD INT* 2012, **11**(1)**:** 34-39.
248. Ollinger R, Pratschke J. Role of heme oxygenase-1 in transplantation. *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation* 2010, **23**(11)**:** 1071-1081.