

Julia Roteta Rocamora

Médica Inmunóloga Clínica

Tesina para la “Maestría en Biología Molecular Médica”:

“Efecto inmunomodulador del SLPI en trasplante renal”

Director de tesina: Dr. Eduardo Chuluyán.

Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos

Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, Argentina

Paraguay 2155 17° piso, C1121ABG - CABA

Teléfono: 4508-3680 / 4962- 4431/ 4435 Int. 107

E-mail: echuluyan@gmail.uba.ar

“Efecto inmunomodulador del SLPI”

Julia Roteta Rocamora

Médica Inmunóloga Clínica

2016

Agradezco profundamente al Dr. Eduardo Chuluyán por abrirme las puertas de su laboratorio, permitiéndome colaborar con su equipo de trabajo. Ha sido una experiencia invaluable para mi formación y un ejemplo de honestidad, humildad y sabiduría en el ámbito científico.

Agradezco a Nella Ambrosi y Diego Guerrieri, excelentes compañeros y guías, por la buena predisposición que siempre demostraron frente a mis múltiples necesidades técnicas e inexperiencia de laboratorio.

Agradezco al Dr. Rubén Schiavelli, quien me diera la posibilidad de desempeñar mi labor diaria en el ámbito del trasplante, por su reiterado apoyo a mi desarrollo profesional, su calidez humana y su ejemplo de búsqueda constante de la excelencia médica.

Dedicada a mis padres: Graciela Rocamora Heras y Miguel Angel Roteta.

| | |
|----------------|---------------|
| RESUMEN | pág. 1 |
|----------------|---------------|

| | |
|-----------------|---------------|
| ABSTRACT | pág. 2 |
|-----------------|---------------|

| | |
|---------------------|---------------|
| INTRODUCCIÓN | pág. 3 |
|---------------------|---------------|

- I. El trasplante renal. Definiciones y problemática actual. (pág. 3)
- II. Inmunosupresión en trasplante renal. (pág. 5)
 - 1- Drogas inmunosupresoras y esquemas de inmunosupresión habituales. (pág. 6)
 - 2- Mecanismos de acción y perfil de seguridad de los inmunosupresores. (pág. 8)
 - a. Inhibidores de calcineurina. (pág. 8)
 - b. Antiproliferativos. (pág. 8)
 - c. Inhibidores de m-TOR. (pág. 9)
- III. Biomarcadores en trasplante renal. (pág. 11)
- IV. Generalidades y estructura molecular de SLPI. (pág. 12)
 - 1- Regulación de la expresión y actividad de SLPI. (pág. 13)
 - a. Transcripción de SLPI. (pág. 13)
 - b. Regulación post-traducciona l de SLPI. (pág. 15)
 - 2- Funciones de SLPI. (pág. 16)
 - a. Regulador de la actividad enzimática. (pág. 16)
 - b. SLPI como inhibidor de la actividad del NF- κ B. (pág. 17)
 - c. SLPI como agente antimicrobiano. (pág. 17)
 - d. SLPI como agente cicatrizal. (pág. 19)
 - e. SLPI como regulador de la proliferación celular, la diferenciación y la apoptosis. (pág. 20)

| | |
|------------------|----------------|
| OBJETIVOS | pág. 23 |
|------------------|----------------|

- I. Obtención de SLPI recombinante humano. (pág. 24)
 1. Expresión de SLPI. (pág. 24)
 2. Purificación de SLPI. (pág. 24)
 3. Pureza del SLPI (pág. 25)
 4. Diálisis del SLPI y elusión por PolimixinaB (pág. 25)
 5. Actividad anti-serinoproteasa (pág. 25)
 6. Cuantificación de la concentración de proteína (pág. 26)
- II. Obtención de células y medios condicionados. (pág. 26)
 1. Individuos y Pacientes. (pág. 26)
 2. Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (pág. 27)
- III. Cultivos Celulares. (pág. 27)
 - 1- Ensayos de proliferación celular (pág. 27)
 - 2- Determinación de niveles de SLPI séricas de individuos estudiados (controles sanos, en el pre-trasplante y en el post-trasplante) (pág. 27)
 - 3- Obtención de monocitos (pág.28)
 - 4- Apoptosis de células tubulares renales (HK-2) (pág.29)
 - 5- Análisis estadístico. (pág.29)

RESULTADOS**pág. 30**

- I. SLPI sérico. (pág.30)
- II. Proliferación leucocitaria (pág.33)
- III. SLPI y Proliferación leucocitaria (pág.38)

DISCUSIÓN**pág. 39**

CONCLUSIONES**pág. 44**

BIBLIOGRAFÍA**pág. 45**

Indice de Tablas y Figuras

| | |
|--|--------|
| Tablas | |
| 1- Grupos de inmunosupresores utilizados en trasplante renal. | Pág 7 |
| 2- Efectos adversos de las drogas inmunosupresoras usadas habitualmente en trasplante renal. | Pág 7 |
| 3- Expresión relativa del mRNA de SLPI humano en diferentes órganos y tejidos. | Pág 13 |
| Figuras | |
| 1- Representación esquemática de los eventos de señalización intracelular asociados a la activación de las células T. | Pág 10 |
| 2- Representación esquemática de la cadena polipeptídica del Inhibidor Secretorio de Proteasas Leucocitarias. | Pág 13 |
| 3- Síntesis de las principales acciones de SLPI | Pág 22 |
| 4- Niveles séricos de SLPI en pacientes trasplantados, individuos sanos y en el pre-trasplante. | Pág 30 |
| 5- Niveles séricos de SLPI en función de la edad en pacientes trasplantados, individuos sanos y en el pre-trasplante. | Pág 31 |
| 6- Niveles séricos de SLPI y SLPI/edad en función del género en individuos sanos, en pacientes en pre-trasplante y pacientes trasplantados | Pág 31 |
| 7- Correlación entre SLPI o SLPI/edad y Tiempo post-trasplante. | Pág 32 |
| 8- Correlación entre SLPI sérico y creatininemia, uremia y MDRD | Pág 32 |
| 9- Efecto del tratamiento inmunosupresor de mantenimiento sobre los niveles de SLPI sérico. | Pág 33 |
| 10- Producción de SLPI por monocitos derivados de pacientes inmunosuprimidos. | Pág 34 |
| 11- Índice de proliferación leucocitaria. PBMC fueron cultivados durante 5 días en presencia o ausencia de PHA. | Pág 35 |

| | |
|---|--------|
| 12- Índice de proliferación leucocitaria en función del tiempo de post-trasplante. | Pág 35 |
| 13- Índice de proliferación leucocitaria en función de la urea y el MDRD. | Pág 36 |
| 14- Índice de proliferación leucocitaria en presencia de SLPI. | Pág 36 |
| 15- Porcentaje de Inhibición de SLPI sobre la proliferación leucocitaria en función del tiempo post-trasplante. | Pág 37 |
| 16- Índice de proliferación y niveles SLPI sérico en pacientes trasplantados. | Pág 38 |
| 17- Conclusiones del efecto inmunomodulador de SLPI en pacientes con trasplante renal. | Pág 43 |

Abreviaturas:

AKI: *acute kidney injury* (injuria renal aguda)

AMPc: Adenosín monofosfato cíclico

AZA: azatioprina

C/EBP β : enhancer-binding protein beta

CMSP: células mononucleares de sangre periférica

CsA: Ciclosporina A

C-terminal: extremo carboxilo terminal

CYP3A4: citocromo P450 3A4

DGF: *delay graft function* (retardo en la funcionalidad del injerto).

DNA: *deoxyribonucleic acid* (ácido desoxirribonucleico)

EC-MPA: micofenolato sódico

NE: *Neutrophil elastase* (elastasa neutrofílica)

FK ó FK506: tacrolimus

FKBP: *FK-binding protein*

HLA: acrónimo del inglés *Human Leukocyte Antigens* (antígenos leucocitarios humanos)

IL: interleuquina

ICN: inhibidores de calcineurina

INF: interferon

IMPDH: Inosina-5'-monofosfato dehidrogenasa

LEF-1: Lymphoid enhancer-binding factor 1

LPS: lipopolisacáridos

MDRD: *Modification of Diet in Renal Disease*. Ecuación para estimar la tasa de filtrado glomerular con valores de cretinemia.

MMF: micofenolato mofetil

MPA: ácido micofenólico

mRNA: *messenger RNA* (RNA mensajero)

miRNA: micro RNA

mTORi: *mammalian Target of Rapamycin inhibitor* (inhibidores de la diana de rapamicina en células de mamífero)

NTA: necrosis tubular aguda

NF κ B: nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

N-terminal: extremo amino terminal

PHA: *Phytohaemagglutinin* (Fitohemaglutinina)

PBMC: *Peripheral blood mononuclear cells* (Células mononucleares de sangre periférica)

RAPA: rapamicina (sinónimo intercambiable de sirolimus en esta tesina)

RNA: *ribonucleic acid* (ácido ribonucleico)

SRL: sirolimus (sinónimo intercambiable de rapamicina en esta tesina)

SLPI: *secretory leukocyte protease inhibitor* (inhibidor secretorio de proteasas leucocitarias humano)

rhSLPI: recombinant human SLPI (SLPI recombinante humano)

TNF- α : *tumor necrosis factor alfa* (factor de necrosis tumoral alfa)

WAP: *whey acidic protein* (proteínas ácidas del suero)

4-DSC: 4-disulphide core (núcleos de 4 disulfuros)

Resumen:

El trasplante renal es un procedimiento terapéutico que ha logrado prolongar la vida de los individuos con insuficiencia renal crónica. Sin embargo, aún hoy no es posible la sobrevida del injerto sin que el paciente deba ser sometido a un tratamiento inmunosupresor que altera la homeostasis del sistema inmune, poniendo en riesgo la vida del paciente. Es por esto que se requieren estrategias tendientes a evaluar el estado inmunológico del paciente. El objetivo de este trabajo fue estudiar la función de un inhibidor de serino proteasas denominado SLPI en los pacientes trasplantados renales, con la intención de determinar si este parámetro podría ser útil como indicador del estado inmunológico del paciente inmunosuprimido. Los resultados indicaron que los pacientes trasplantados renales presentan niveles elevados de SLPI sérico comparados con los individuos sanos. Sin embargo, estos niveles fueron menores comparados con los que se observan en los pacientes en el pre-trasplante. Por otro lado, el tratamiento inmunosupresor influye sobre los niveles de SLPI, ya que los pacientes tratados con micofenolato mofetil + esteroides + rapamicina presentan niveles superiores a los pacientes tratados con micofenolato mofetil + esteroides + tacrolimus. Como era de esperar, la capacidad proliferativa de los leucocitos mononucleares en respuesta a mitógenos fue menor en los pacientes inmunosuprimidos con respecto a los individuos sanos. Sin embargo, el tratamiento de las células in vitro con SLPI, produjo una disminución de la proliferación celular inducida por un mitógeno, en ambos grupos de individuos (inmunosuprimidos y sanos). Llamativamente, aquellos individuos con mayores niveles de SLPI plasmático presentaron menores índices de proliferación celular, pero se correlacionaron con una menor función renal. En general estos resultados indican que el SLPI es un marcador de daño renal con capacidad inmunomoduladora. Su posible utilización como marcador del estado inmunosupresor deberá ser validado con un número mayor de individuos y probablemente dependerá del tratamiento inmunosupresor instaurado.

Abstract:

Kidney transplantation is a therapeutic procedure that has made possible to prolong life of individuals with chronic renal dysfunction. However, even today graft survival is not possible without a patient under immunosuppressive treatment, modifies the homeostasis of the immune system, jeopardizing patient's life. That's why strategies to evaluate patient's immune status are required. The aim of this work was to study the role of an inhibitor of serine proteases called SLPI in renal transplant patients, with the intent to determine if this parameter could be useful as an indicator of immune status of the immunosuppressed patient. The results indicated that renal transplant patients have elevated levels of serum SLPI compared with healthy individuals. However, these levels were lower compared to those seen in patients in pre-transplantation. Furthermore, immunosuppressive therapy influences SLPI levels as patients treated with mycophenolate mofetil + rapamycin + steroids have higher levels patients treated with mycophenolate mofetil + steroids + tacrolimus. As expected, the proliferative capacity of mononuclear leukocytes in response to a mitogen was lower in immunosuppressed patients compared to healthy individuals. However, treatment of cells in vitro with SLPI produced a decrease in cell proliferation induced by a mitogen, in both groups of individuals (healthy and immunosuppressed). Interestingly, those individuals with higher plasma levels of SLPI had lower rates of cell proliferation, but correlated with reduced renal function. Overall, these results indicate that SLPI is a marker of renal damage with an immunomodulatory capacity. Its possible use as a marker of immunosuppressive state must be validated with a larger number of individuals and likely will depend on the immunosuppressive therapy in progress by that time.

INTRODUCCIÓN:

I - El trasplante renal. Definiciones y problemática actual.

El trasplante es un tratamiento ampliamente utilizado en la medicina actual para corregir una deficiencia anatómica o funcional. Es un proceso a través del cuál se toman células, tejidos u órganos, de un individuo y se colocan en otro, habitualmente distinto. Se definen entonces, dos actores: el donante y el receptor o huésped[1].

El trasplante renal es, en la actualidad y desde hace años, la terapia de elección para un gran número de causas que llevan a la insuficiencia renal terminal. Mejora la calidad de vida al prescindir de la dependencia a la diálisis y cuando se lo compara con ésta, es más económico y aumenta la sobrevida de los pacientes a largo plazo. Es un procedimiento rutinario y existen contadas contraindicaciones absolutas para su realización, entre ellas: cáncer reciente o metastásico, infección activa aguda o crónica, alto riesgo quirúrgico, expectativa de vida menor a 2 años, enfermedad psiquiátrica grave, crónica y no controlable. Su aplicabilidad está limitada a la disponibilidad de riñones en relación con la demanda creciente de pacientes que lo precisan. Este desequilibrio entre pacientes en lista de espera y disponibilidad de órganos de origen cadavérico ha forzado la búsqueda de donantes que otrora eran desestimados, es por ello que se ha ido incrementando la edad de los donantes y se utilizan riñones con criterios expandidos (donante mayor a 60 años de edad o bien, entre 50 y 59 años con al menos 2 de los 3 siguientes criterios: a- accidente cerebrovascular como causa de muerte, b- hipertensión de larga data, c- creatinina pre-ablación mayor a 1,5 mg/dl) o con funcionalidad subóptima o provenientes de donantes a corazón parado (asistolia).

La opción del trasplante renal con donante vivo es una excelente alternativa, pues permite una cirugía programada, puede llevarse a término en situación de prediálisis o *preemptive* y está indicada, preferentemente, en gente joven en quienes las perspectivas futuras hacen pensar en la posibilidad de más de un trasplante a lo largo de la vida.

Los factores que más influyen en la supervivencia del injerto son el grado de compatibilidad antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad o HLA (mayor en pacientes HLA idénticos, seguido de los que comparten un haplotipo y finalmente en los que no presentan compatibilidad alguna en HLA), la isquemia fría y la función renal retardada del injerto (DGF: delay graft function), el tipo de inmunosupresión, la incidencia de rechazo agudo y el efectuar el trasplante en situación de *preemptive*. Hasta un 25-50% de los trasplantes renales presentan una disfunción inicial del injerto con oliguria o anuria sobre todo por necrosis tubular aguda (NTA). Se trata de la complicación más frecuente en pacientes de alto riesgo inmunológico y en los que reciben un injerto de donante añoso sobre todo si el

trasplante se ha recibido en condiciones de hipotensión y si ha tenido un tiempo de isquemia fría y de sutura prolongados. Habitualmente, se resuelve en días, pero si la oliguria persiste en la segunda semana post-trasplante se debe realizar una biopsia para descartar rechazo agudo o nefrotoxicidad por anticalcineurínicos.

¿Cuáles son las causas de la pérdida de los trasplantes renales?

Durante el primer año, según el registro norteamericano "UNOS Scientific Renal Transplant Registry" (n= 10.464 pacientes), las principales causas son: la muerte del paciente (27%), rechazo agudo (18%), rechazo crónico (11%), fallo primario del injerto (7%), problemas técnicos vasculares tipo trombosis o urológicos (8%). Tras el primer año (n = 12.805 pacientes) la principal causa de fallo del injerto fue la nefropatía crónica del injerto o rechazo crónico (44%), la muerte del paciente con injerto funcionando (23%), el rechazo agudo (10%), la enfermedad recurrente (5%), y los problemas vasculares o urológicos (2%). La comprensión de la historia natural de la pérdida del trasplante ha evolucionado significativamente. En un estudio paradigmático de biopsias de protocolo, Nankivell et al[2] describió la historia natural de "nefropatía crónica del injerto" en pacientes en tratamiento con inmunosupresión basada principalmente en la ciclosporina y mostró la existencia de una significativa fibrosis intersticial / atrofia tubular (IFTA) a los 5 años del trasplante. Un estudio más reciente basado en biopsias de protocolo de pacientes con un esquemas más modernos de inmunosupresión (tacrolimus o sirolimus) mostró que al primer año de trasplante sólo hubo IFTA leve y, que había una menor progresión y gravedad de la IFTA a los 5 años postrasplante[3]. Este mismo grupo también mostró que las causas subyacentes de la pérdida de la funcionalidad del injerto trasplante son en gran parte identificables, principalmente inmunomediadas y, potencialmente susceptibles de intervención[4].

El rechazo es la principal complicación tras el trasplante renal.

Los rechazos se pueden clasificar en hiperagudo, acelerado, agudo y crónico o también llamado éste último como nefropatía crónica del injerto.

El rechazo hiperagudo ha dejado de ser una causa importante de pérdida de injertos renales por una adecuada práctica de valoración rutinaria pre-trasplante que permite optimizar la compatibilidad entre donante y receptor respecto a los antígenos de grupo sanguíneo ABO y fundamentalmente con la prueba cruzada (cross match) en el pretrasplante inmediato para descartar la presencia de anticuerpos anti HLA del receptor dirigidos hacia los antígenos HLA del donante.

En la era de la inmunosupresión moderna, las tasas de rechazo agudo han disminuido significativamente, mejorando de esta manera los resultados del trasplante a corto plazo,

pero, a largo plazo las tasas de supervivencia del trasplante más allá de 5 años no han logrado una mejoría significativa [5,6] y, el trasplante renal es una de las 4 causas más comunes de enfermedad renal en etapa terminal[7]. El retorno a la terapia de diálisis después de la pérdida del trasplante se asocia con una menor calidad de vida, aumento de los costos en salud, sensibilización inmunológica que dificultan las posibilidades de retrasplante y generan un mayor riesgo de muerte[8,9].

De acuerdo con el Sistema de Datos de enfermedad Renal de los Estados Unidos (US Renal Data System) la sobrevida ajustada a 10 años después de la pérdida de un trasplante es menor al 40% mientras que en aquellos con trasplante funcionando es mayor al 75%[8]. Así mismo, según el Registro Canadiense de Trasplante de Órganos, la pérdida del injerto es un predictor independiente de mortalidad con un aumento de hasta 3 veces el riesgo de muerte comparado con pacientes que mantienen la función del injerto[9].

Por lo tanto, la búsqueda de marcadores no invasivos de la función inmunológica y la detección precoz de la lesión inmunomediada pueden ser la claves para mejorar el trasplante a largo plazo [10].

II - Inmunosupresión en trasplante renal.

El tratamiento inmunosupresor es necesario mientras dure la función del injerto y su objetivo es prevenir o controlar la respuesta inmune del receptor contra el órgano trasplantado para incrementar la supervivencia del injerto y el paciente. No se dispone en la actualidad del inmunosupresor "ideal" pero en los últimos años se ha incrementado el arsenal terapéutico con fármacos más potentes y específicos que buscan un mejor perfil de seguridad. El tratamiento debe ser individualizado existiendo múltiples combinaciones adaptables a las características clínicas y serológicas de cada paciente, al momento en curso del trasplante renal y a la experiencia de cada centro.

La inmunosupresión en trasplante puede simplificarse de la siguiente manera:

Inmunosupresión primaria. Tiene como objetivo prevenir el rechazo hiperagudo, agudo y crónico. Durante las primeras semanas post-trasplante se denomina terapia de inducción por ser más intensa y potente. Le seguirá la terapia de mantenimiento, que se administra de forma crónica y sus dosis tienen mayor margen de seguridad.

Tratamiento del rechazo. Trata de frenar la lesión inmunológica del injerto. Es muy potente, de corta duración y capaz de favorecer infecciones graves que de no ser reconocidas a tiempo pueden poner en riesgo de vida a los pacientes.

1- Drogas inmunosupresoras y esquemas de inmunosupresión habituales.

Los diversos fármacos o agentes inmunosupresores se pueden clasificar por su mecanismo de acción, estructura química, perfil de seguridad, etc y, se agrupan a grandes rasgos en seis grupos: 1- *esteroides* (prednisona o meprednisona, esta última conocida comercialmente como “Deltisona”), 2- *inhibidores de calcineurina* –ICN- (Ciclosporina A –CsA- y tacrolimus –FK506-), 3- *antiproliferativos o inhibidores de la síntesis de nucleosidos* (azatioprina –AZA-, micofenolato mofetil -MMF- y micofenolato sódico –EC-MPA-), 4- *inhibidores de mTOR* –mTORi- (rapamicina -RAPA- o sirolimus -SRL- y everolimus), 5- *anticuerpos mono- o poli-clonales* (inmunoglobulinas antitimocíticas derivadas de conejo –Timoglobulina o ATG -, antitimocíticas derivadas de caballo- ATGAM- y antilinfocíticas anti CD3 –OKT3- y anti CD52 -Alemtuzumab-), 6- anticuerpos monoclonales anti-receptor de interleuquina 2 -anti-CD25- (Basiliximab y Daclizumab). (Tabla 1)[11].

El **tratamiento de inducción** intenta ser potente e intenso para prevenir el rechazo en la fase de máxima respuesta inmunológica que se produce en las primeras semanas del trasplante renal.

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 (retrasplantes, hipersensibilizados y jóvenes con alta respuesta inmunológica) o en aquellos pacientes en los que es conveniente evitar el uso de los anticalcineurínicos en la fase de inducción (donantes subóptimos: donantes añosos, donantes a corazón parado, tiempo de isquemia fría prolongada, etc.)[12].

A la inducción le sigue a la **terapia 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. En esta fase los principales problemas que se afrontarán serán el rechazo agudo, la nefropatía crónica del injerto, la morbi-mortalidad cardiovascular, el desarrollo de infecciones y de tumores. El tratamiento será lo menos agresivo posible y se procurará que tenga un buen perfil de seguridad para que no facilite las patologías antes mencionadas (Tabla 2).

Es fundamental por otro lado facilitar la adhesión al tratamiento, informando a los pacientes los riesgos de abandonar la inmunosupresión o de no tomar las dosis correspondientes a intervalos adecuados.

Tabla 1- Grupos de inmunosupresores utilizados en trasplante renal (11) .

| Familia terapéutica | Fármaco | Terapia de inducción | | Terapia de mantenimiento |
|---|-----------------------------|---|---|--|
| | | Dosis | Niveles | Niveles -Comentarios |
| Corticosteroides | Prednisona | 125-500 mg 0,5 mg/kg/d (descenso progresivo) | | Valorar eliminación progresiva con dosis de 10 mg al tercer mes y 5 mg al sexto. Posible suspensión al año en 75% |
| Inhibidores de la calcineurina | Ciclosporina (S. Neoral) | 8-10 mg/kg/d (oral) 3 mg/kg/d (iv) | C-0 = 150-250 ng/ml C-2 = 1400-1800 | C0 = 75-150 ng/ml C2 = 400-800 ng/ml |
| | Tacrólimus (Prograf) | 0,2 mg/kg/d (oral) 0,04 mg/kg/d (iv) | 10-15 ng/ml | 5-10 ng/ml |
| Inhibidores de la síntesis de nucleosidos | MMF ⁽¹⁾ | 1-2 g/d | 2-4 ng/ml | 1-4 ng/ml |
| | EC-MPA ⁽²⁾ | 620-1440 ng/ml | 2-4 ng/ml | 1-4 ng/ml |
| | Azatioprina | 1-3 mg/kg/d | | 1-1,5 mg/kg/d |
| Inhibidores de m-TOR | Sirólimus | 2-5 mg/d | 5-15 ng/ml | 5-10 ng/ml (10-18 si monoterapia) (4 horas tras la CyA) |
| | Everólimus | 1,5-3 mg/d | 4-8 ng/ml | -8 ng/ml (8-12 si monoterapia) |
| Anticuerpos policlonales anti-linfocito | ATG ⁽³⁾ | 1,25-5 mg/kg/d (5-10 dosis) | Controles de CD4 y hemograma (leucos y plaquetas) | Realizar profilaxis para CMV, VEB |
| Anticuerpos monoclonales anti-linfocito | OKT3 | 2,5-5 mg/día 5-10 dosis | Controles de CD3 | Realizar profilaxis para CMV y VEB. Mayor riesgo ELPP ⁽⁴⁾ |
| Anti CD25 | Baxiliximab | 20 mg iv dosis día 0 y día 4 | | |
| | Daclizumab | 1 mg/kg/día (iv) 2 a 5 dosis cada 15 días. | | |

(1) MMF = Micofenolato Mofetil (Cellcept).

(2) EC-MPA = Ácido micofenólico con cubierta entérica (Myfortic).

(3) ATG = Globulina antitímocito o Timoglobulina.

(4) ELPP = Enfermedad linfoproliferativa postrasplante.

Tabla 2- Efectos adversos de las drogas inmunosupresoras usadas habitualmente en trasplante renal (12).

| Fármaco | HTA | Dislipemia | DM | Nefro- toxicidad | Dispepsia | Neuro- toxicidad | Mielo- toxicidad | Hipertrofia | Hirsutismo Hipertriosis |
|---------------------------|-----|------------|-----|---------------------|-----------|---------------------|---------------------|-------------|----------------------------|
| Ciclosporina | +++ | ++ | + | +++ | + | ++ | - | +++ | +++ |
| Tacrólimus | ++ | + | ++ | ++ | + | +++ | - | + | + |
| Sirólimus ó Everólimus | - | +++ | - | - | + | - | ++ | - | - |
| MMF / EC-MPA | - | - | - | - | +++ | - | ++ | - | - |
| Corticoides | ++ | ++ | +++ | - | ++ | - | - | - | ++ |

MMF = Micofenolato Mofetil (Cellcept).

EC-MPA = Micofenolato sódico (Myfortic).

HTA = Hipertensión arterial.

DM = Diabetes mellitus.

2- Mecanismos de acción y perfil de seguridad de los inmunosupresores.

A continuación se describen someramente los mecanismos de acción de las drogas inmunosupresoras de interés para la interpretación de los resultados de esta tesis.

a- Inhibidores de calcineurina:

La ciclosporina y el tacrolimus son similarmente eficaces en prevenir el rechazo y prolongar la supervivencia del injerto, pero sus efectos adversos son diferentes.

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, su 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 , INF- 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 1).

El sistema citocromo P450 3A4 (CYP3A4) del hígado y tracto gastrointestinal es responsable del metabolismo de estos fármacos y es necesario el monitoreo de los niveles séricos para un óptimo manejo de las dosis (existe una mejor correlación entre los niveles séricos y la exposición a la droga con tacrolimus que con ciclosporina). Existen fármacos inductores y otros que inhiben al CYP3A4, así como variaciones en la farmacocinética entre las distintas formulaciones comerciales, de modo que se recomienda conocer las posibles interacciones farmacológicas y no realizar cambios de marca una vez iniciado el tratamiento. Son excretados por bilis y mínimamente por riñón[11].

b- Antiproliferativos:

Azatioprina: La azatioprina es un metabolito de la 6-mercaptopurina que es procesada intracelularmente como un análogo de purina. Inhibe la síntesis de purinas tanto de la vía de novo como en la vía de salvataje. Se suprime de este modo el proceso de replicación génica y proliferación celulares por la inhibición de la síntesis de RNA y DNA(Figura 1).

Si bien es más selectiva para los linfocitos T, puede suprimir a los promielocitos de médula ósea, generando leucopenia, trombocitopenia y/o anemia.

No hay necesidad de dosaje de niveles séricos porque su efectividad no se basa en los niveles en sangre[11]

Micofenolato: Es una prodroga del ácido micofenólico (MPA). Ha ido reemplazando a la azatioprina por su menor cantidad de efectos adversos y superioridad en prevenir el rechazo agudo. La MPA inhibe en forma reversible a la inosina monofosfato dehidrogenasa (IMPDH) que es crítica en la síntesis de purinas. El micofenolato bloquea la síntesis de ácidos nucleicos (Figura 1). Sin embargo, su efecto es relativamente selectivo de los linfocitos, no sólo porque estos tienen una isoforma más susceptible de Inosina-5'-monofosfato dehidrogenasa (IMPDH), sino porque requieren de la síntesis *de novo* de purinas más que otras células, en donde existe una vía de salvataje de purinas.

El micofenolato está disponible como mofetil (MMF) o sódico (EC-MPA). Produce dos picos séricos, uno inicial al hidrolizarse en el hígado y otro tardío vinculado a su reabsorción por ciclo enterohepático, de ahí sus efectos adversos gastrointestinales que son mayores con MMF que con EC-MPA. No es necesario monitorear sus niveles séricos.

c- Inhibidores de m-TOR (mammalian Target of Rapamycin inhibitor -mTORi-):

También se trata de un antiproliferativo. Su target es la rapamicina, una quinasa importante en la regulación del ciclo celular. Existen dos drogas en este grupo de fármacos, Rapamicina (RAPA) o Sirolimus (SRL) y el Everolimus.

El sirolimus se une a la FKBP al igual que el tacrolimus, pero no bloquea a la calcineurina sino a TOR. TOR es una quinasa reguladora que participa en la división celular, de modo que bloquea la señal de proliferación de los factores de crecimiento en las células T, impidiendo su ingreso en la fase S del ciclo celular (Figura 1).

La inhibición de TOR no sólo ocurre en linfocitos, sino también en células mesenquimales, células endoteliales, células de la musculatura lisa vascular, de modo que su efecto antiproliferativo implica una menor remodelación vascular aterosclerótica (uno de los mecanismos de la nefropatía crónica del injerto), una menor neoangiogénesis (mecanismo de diseminación neoplásica) y es por ello que se lo reconoce como un nefroprotector cuando se utiliza tempranamente en el trasplante renal y antitumoral, sobre todo en pacientes con antecedentes neoplásicos en los que la elección de la inmunosupresión debe evitar la reaparición tumoral.

Se metaboliza vía CYP 3A4 y al igual que los INC tiene variaciones en su biodisponibilidad que hacen que deban dosarse sus niveles séricos y estar alerta ante posibles interacciones con otros fármacos.

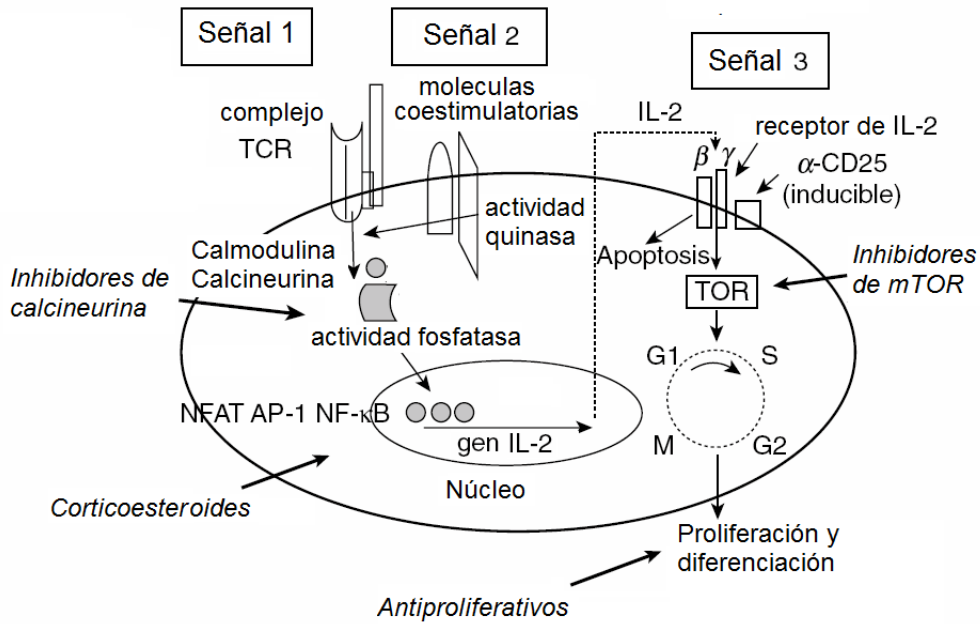


Figura 1. Representación esquemática de los eventos de señalización intracelular asociados a la activación de las células T.

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. (Adaptado de Primer on Transplantology. D. Hricik. 3ª ed.; 2012)

Los inhibidores de calcineurina (ICN) producen nefrotoxicidad que puede manifestarse en forma aguda con cambios hemodinámicos reversibles en la vasculatura glomerular y lesiones agudas como la vacuolización isométrica de las células tubulares y la hialinosis arteriolar; además, en forma crónica producen fibrosis intersticial / atrofia tubular con la eventual pérdida del injerto[13,14],

La principal estrategia para hacer frente a la nefrotoxicidad de los ICN incluye la minimización o eliminación de los ICN, con o sin la conversión a rapamicina[15,16].

En una revisión sistemática de pacientes con nefropatía crónica del injerto, el reemplazo de los ICN con rapamicina resultó en una mejoría a corto plazo o una estabilización de la función renal. Sin embargo, la conversión a rapamicina se asoció con una alta tasa de interrupción del tratamiento por progresión y/o aparición de proteinuria. Pero, el resultado más alentador es que la conversión a rapamicina resultó en una menor incidencia de neoplasia postrasplante y debe considerarse en pacientes con tumores malignos o con un mayor riesgo de malignidad en el período post-trasplante[17].

Hoy en día, se acepta que en pacientes con creatininemias mayores a 2,5 mg/dl ó proteinuria >1,5 g/24hs no deberían “convertirse”.

Son indicaciones de conversión a rapamicina: a- Nefropatía crónica del injerto. b- Hipertensión (HTA) severa. c- Neoplasias malignas. d- Diabetes (DBT) postrasplante. e- síndrome urémico hemolítico (SUH) por anticalcineurínicos. f- Efectos estéticos por el uso de ICN[18].

III- Biomarcadores en trasplante renal.

La búsqueda de biomarcadores en sangre periférica y orina de pacientes receptores de injertos renales representa un desafío para la comunidad científica. Por un lado, la biopsia renal ha sido siempre el *gold standard* para asesorar sobre la respuesta inmune del aloinjerto renal. Una biopsia, no está libre de complicaciones, entre ellas la pérdida del injerto y, sólo sirve para establecer el diagnóstico de rechazo cuando éste ya ha acontecido, es decir, no permite anticipar el curso clínico para corregir el manejo terapéutico tendiente a evitarlo. Por otro lado, las drogas inmunosupresoras pueden ser dosadas en sangre con la finalidad de mantener sus niveles en rangos no tóxicos, pero los niveles séricos no reflejan el grado de inmunosupresión a nivel celular[19].

En la práctica clínica, la herramienta ideal para el monitoreo de la respuesta inmune a aloinjertos debe ser mínimamente invasiva, de bajo costo, reproducible y, accesible para los laboratorios clínicos hospitalarios donde rutinariamente se evaluarán a estos pacientes.

Recientemente, se ha reportado en estudios de asociación de genoma completo con perfiles de mRNA (RNA mensajeros) y miRNA (microRNAs) que SLPI representa un potencial biomarcador para la injuria renal aguda (AKI: acute kidney injury) en post-trasplante[20]. Esto nos motivó a evaluar el rol del SLPI en pacientes trasplantados renales con distintos esquemas de inmunosupresión.

IV - Generalidades y estructura molecular de SLPI.

El Inhibidor Secretorio de Proteasas Leucocitarias (SLPI) humano fue aislado originalmente de secreciones bronquiales y posteriormente fue caracterizado por dos grupos de forma independiente en el año 1986[21,22].

Es miembro de la familia de moléculas WAP (whey acidic protein), que constituyen el principal componente de la fracción ácida del suero y particularmente abundante en las proteínas de la leche. Posee homólogos en ratones, ratas, cerdos y ovejas[23].

Las proteínas WAP difieren bastante en sus secuencias, excepto por sus regiones ricas en cisteínas, conocidas como núcleos de 4 disulfuro (4-DSC:4-disulphide core) y, ciertos residuos aminoácidos en posiciones específicas[24].

SLPI 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[25].

El gen del SLPI humano consiste de cuatro exones y tres intrones[26]. Es una proteína de secreción, de 107 aminoácidos, simple cadena, no glicosilada, de bajo peso molecular (kDa 11,7). Contiene dos dominios WAP (WAP I y WAP II), de modo que presenta fuertes uniones intramoleculares por puentes disulfuro (8 en total) y una carga neta positiva.

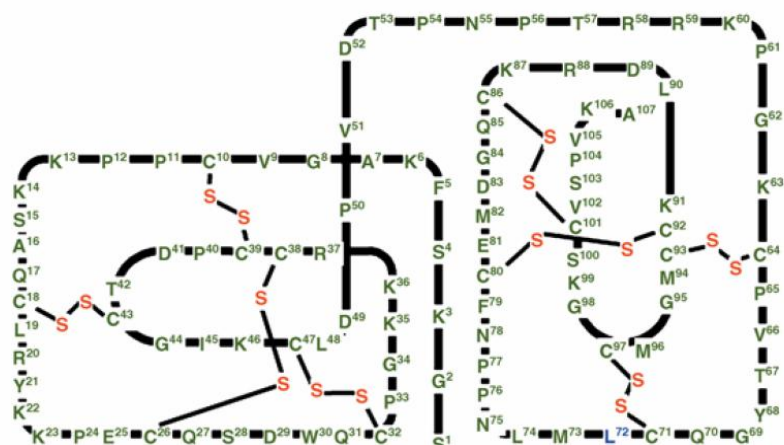
El dominio WAP II, es el principal responsable de la función inhibitoria de SLPI contra proteasas, más precisamente los residuos 67-74[24].

Inhibe a un importante grupo de enzimas: elastasa neutrofílica, catepsina G, tripsina, quimiotripsina, triptasa y, quimasa. La función biológica del dominio WAP I (N-terminal) es menos conocida, aunque se cree que la actividad antimicrobiana de SLPI podría residir principalmente en este dominio.

Se expresa constitutivamente en varias superficies mucosas, pero también es producida por las células efectoras del sistema inmune, incluyendo los mastocitos, neutrófilos y macrófagos. La síntesis de SLPI por las células inflamatorias genera niveles sustanciales de SLPI en los infiltrados de células inmunes asociadas con enfermedades inflamatorias crónicas como la artritis, el asma y la psoriasis[27].

Pero, el SLPI no es solamente un inhibidor de proteasas extracelulares capaz de evitar los daños de la activación neutrofílica excesiva, como se creyó inicialmente y detallaremos posteriormente en las funciones de SLPI.

Figura 2: Representación esquemática de la cadena polipeptídica del Inhibidor Secretorio de Proteasas Leucocitarias (SLPI por sus siglas en inglés).



En rojo se destacan los residuos de cisteína que conforman 8 puentes disulfuro. La presencia de 20 aminoácidos básicos tales como lisina (L) y arginina (A) le confieren a esta proteína una carga eléctrica neta positiva.

1- Regulación de la expresión y actividad de SLPI.

a- Transcripción de SLPI:

Los niveles de SLPI se expresan en forma de proteína y mRNA en las células epiteliales de los tractos respiratorio, digestivo y reproductivo, así como en las células de las glándulas parótidas, mama, riñón y piel. Se cree que SLPI que tiene funciones homeostáticas y de protección en estas áreas de primera línea, alcanzando altos niveles micromolares[28-32].

Además de su expresión constitutiva en las células epiteliales, SLPI se expresa de manera transitoria en células mieloides, incluyendo a los macrófagos, granulocitos, células dendríticas y plaquetas, así como en las neuronas, astrocitos y células del músculo esquelético[33-37].

Una gama de estímulos proinflamatorios derivada de microorganismos, a través de la unión a receptores de reconocimiento de patrones (por ejemplo, receptores de tipo Toll), tienen la capacidad de aumentar la expresión de SLPI. Estos estímulos incluyen bacterias, componentes de la pared celular bacteriana (por ejemplo, LPS y ácido lipoteicoico), análogos de RNA viral, y parásitos patógenos.

Tabla 3 – Expresión relativa del mRNA de SLPI humano en diferentes órganos y tejidos.

| Órgano / Tejido | Expresión relativa (%) |
|---------------------|------------------------|
| Tráquea | 100 |
| Bronquios | 85 |
| Mucosa oral | 51 |
| Glándulas salivales | 46 |
| Mucosa faríngea | 29 |
| Esófago | 20 |
| Pulmones | 11 |
| Vagina | 7 |
| Glándulas mamarias | 4 |
| Amígdalas | 4 |
| Tejido adiposo | 3 |
| Médula ósea | 2 |
| Hígado | 2 |
| Glándula prostática | 1 |
| Apéndice cecal | 1 |
| Glándula tiroidea | 1 |
| Testículos | 1 |
| Médula renal | 1 |
| Corteza adrenal | 1 |
| Musculo esquelético | 1 |
| Corteza renal | 0 |
| Ovarios | 0 |
| Nódulos linfáticos | 0 |
| Bazo | 0 |

Controlan la expresión de SLPI las señales de citoquinas tales como: $TNF\alpha$, $IL1\beta$ y linfopoyetina estromal tímica (TSLP)[38,39]. Además, la síntesis de SLPI se incrementa en presencia de su target enzimático, la elastasa neutrofilica (NE)[40].

Se sabe menos acerca de cómo estos factores controlan la producción de SLPI a nivel molecular. La vía dependiente de AMPc es una de las cascadas de señalización intracelular que regulan la expresión de SLPI. Existen reguladores down-stream de SLPI como los factores de transcripción LEF-1 y $C/EBP\alpha$, en donde LEF-1 es capaz de activar a $C/EBP\alpha$ y éste se une los sitios de unión del promotor de SLPI[40].

Aunque la expresión SLPI es up-regulada principalmente por agentes proinflamatorias, estos también pueden producir su down-regulación. Por ejemplo, el $IFN-\gamma$ inhibe la síntesis de SLPI basal e inducida por LPS en los macrófagos y puede contribuir a los niveles bajos de SLPI como los que se observan en el asma grave[31,41]. Del mismo modo, la infección de células epiteliales con virus herpes simplex (HSV) reduce los niveles de SLPI como una estrategia de evasión inmune, ya que SLPI puede inhibir al HSV[42].

b- Regulación post-traducciona de SLPI.

El SLPI posee un péptido señal y, como su nombre lo indica, se encuentra predominantemente como un producto de secreción en los fluidos del cuerpo, principalmente en las superficies mucosas. Sin embargo, sus niveles en plasma son aproximadamente 1000 veces más bajos (por debajo de 5 nM en individuos sanos), lo que sugiere que SLPI es menos importante como un efector sistémico circulante que a nivel tisular. Por otra parte, sus funciones sistémicas y locales pueden ser diferentes y requieren diferentes concentraciones para el efecto óptimo[43].

Existe una forma intracelular de SLPI, pero el mecanismo por el cual SLPI es retenido en las células es desconocido. SLPI puede potencialmente ingresar a la célula y cruzar las membranas nucleares probablemente debido a su cationicidad, ya descritas[44,45].

Se postula que SLPI ingresa a las células a través de dos posibles mecanismos: independiente o dependiente de receptores. El mecanismo independiente de receptor involucra la interacción con los glicosaminoglicanos de la membrana celular, con posterior endocitosis (la unión de SLPI al heparán sulfato es coherente con esta posibilidad)[46]. Mientras que el mecanismo dependiente de receptor para su ingreso a la célula incluye proteínas de la membrana tales como la anexina A2 (también conocida como la anexina II) y la escramblasa fosfolípido 1, que han demostrado que se unen SLPI [47,48].

La relevancia fisiológica de la capacidad de SLPI de ingresar en las células y modular su respuesta, se evidencia en la observación en la que el SLPI liberado por las células epiteliales que recubren las criptas amigdalares puede detectarse en las células B que pueblan los bolsillos de dichas glándulas, generando una amortiguación en la producción de anticuerpos con cambio de clase (*class-switched*)[49]. La capacidad de SLPI para penetrar las membranas celulares también sugiere un valor terapéutico, que actualmente está en estudio, ya que el uso de este inhibidor administrado exógenamente podría actuar sobre dianas intracelulares con facilidad.

SLPI contiene cuatro residuos de metionina (Met), sensibles a la oxidación; por lo tanto, la bioactividad de SLPI puede verse comprometida por los productos reactivos del metabolismo oxidativo. Consistente con esta noción, la oxidación del residuo Met73 disminuye la actividad inhibidora de elastasa de neutrófilos de SLPI, pero no logra abolirla por completo[50].

SLPI también es susceptible de la escisión proteolítica y se pueden encontrar sus formas escindidas en muestras de fluido de revestimiento epitelial de individuos que sufren de enfisema, pacientes con fibrosis quística infectados con *Pseudomonas aeruginosa* o en muestras de esputo y lavado nasal de individuos con la enfermedad alérgica de las vías respiratorias[51-53].

Las cisteíno- y serino- proteasas del huésped, pueden alterar la bioactividad de SLPI, aunque con consecuencias diferentes. Además, el SLPI puede ser escindido por enzimas derivadas de bacterias tales como la pseudolisina de *Pseudomonas* o la proteasa arginino específica de *Porphyromonas gingivalis*[54,55]. Cuando SLPI es procesado por estas proteasas, se vuelve inactivo para alguna de sus funciones, dependiendo del patrón de procesamiento que tengan dichas enzimas. Por ejemplo, pérdida de la unión a LPS o a los sitios consenso del NFκB[52].

Además de la oxidación y la proteólisis, SLPI puede ser sometido a otras modificaciones postraduccionales en el entorno celular epitelial en el que está inmerso. Por ejemplo, SLPI puede ser unido a varios componentes de la matriz extracelular (MEC), como la fibronectina o la elastina, por acción de la transglutaminasa. La unión covalente a los componentes de MEC puede proteger a estos componentes de la degradación enzimática, ya que SLPI no perdería su actividad anti-proteasa[56,57].

Por lo tanto, la acción concertada de SLPI y las enzimas capaces de modificarlo conducen a una función plena de SLPI.

2- Funciones de SLPI:

a- Regulador de la actividad enzimática:

El papel mejor documentado de SLPI es la inhibición reversible de la elastasa neutrofílica (NE). SLPI representa el 80-97% de la capacidad inhibidora de NE de las secreciones del tracto respiratorio superior en humanos, lo que indica un papel fundamental de SLPI en el control local de la actividad de esta enzima[58,59].

La NE hidroliza proteínas dentro de gránulos especializados de los neutrófilos o procesa los componentes de la matriz extracelular y factores de crecimiento después de su liberación al medio por los neutrófilos activados. Por lo tanto, el SLPI protege a las proteínas de la digestión por la NE. Esta acción tiene profundas consecuencias para el correcto inicio y finalización de las respuestas inflamatorias[60]. Además de la NE, SLPI inhibe la actividad de otras serino-proteasas, pero con menor eficiencia[61,62].

SLPI no sólo controla la actividad enzimática de las proteasas en forma directa sino que también interfiere con la síntesis de estas enzimas; por ejemplo, en los monocitos el SLPI suprime la expresión de metaloproteasas (MMP) MMP1 y MMP9. También frena la conversión de las formas enzimáticas inactivas (zimógenos) a proteasas activas, como cuando sobre la superficie de los macrófagos o células escamosas de carcinoma oral se une a la anexina 2 y bloquea al activador del plasminogeno en la acción de convertir al plasminogeno en plasmina. Por lo tanto y debido a que la generación de plasmina en la superficie celular se asocia a menudo con la capacidad migratoria e invasiva de las células

tumorales, la disminución de la generación de plasmina por SLPI podría tener un potencial uso antitumoral[63,64].

b- SLPI como inhibidor de la actividad del NFκB:

El papel de SLPI en el control de las respuestas inflamatorias claramente se ha demostrado más allá de la inhibición de las serino-proteasas.

SLPI es capaz de atenuar la respuesta de los monocitos / macrófagos al LPS a través de la inhibición del factor de transcripción NFκB. Habitualmente, en la célula en reposo el IκB, secuestra y mantiene inactivo al NFκB en el citoplasma; una vez ocurrida la activación celular, se degrada rápidamente y libera al NFκB que se traslada al núcleo dónde regula la transcripción de genes. El mecanismo de acción de SLPI previene la degradación de los componentes inhibidores de NFκB, como IκBα y IκBβ[65].

Otra forma de inhibir la actividad del NFκB que posee SLPI, es la de competir con el p65-NFκB (un componente del complejo de transcripción NFκB) por la unión a los sitios en las regiones promotoras de genes proinflamatorios, tales como TNFα y CXCL8 [44]. Debido a que NFκB juega un papel central en la regulación de respuestas inmunes y en la proliferación/sobrevivencia celulares, SLPI tiene una capacidad única para mantener la homeostasis en las barreras del cuerpo o dar forma a los procesos inflamatorios. Numerosos estudios demuestran la importancia de SLPI en el establecimiento de un umbral para la activación de las células dendríticas en los ganglios linfáticos de las mucosas, en la inhibición de las células B en la síntesis de inmunoglobulinas con cambio de clase[34,49].

c- SLPI como agente antimicrobiano:

La actividad antibacteriana y antifúngica de SLPI:

La actividad antimicrobiana de SLPI contra las bacterias Gram-positivas (*Saphylococcus aureus*), Gram negativas (*Escherichia coli*) y hongos (*Aspergillus fumigatus*) se ha atribuido principalmente al dominio N-terminal (WAP I) y se cree que el mecanismo subyacente es similar a la de otros péptidos catiónicos, tales como defensinas[66]. Se encontró que el dominio carboxilo terminal (C-terminal) de SLPI, en comparación con el dominio amino terminal (N-terminal), tiene actividad bactericida muy débil, pero aún menores son sus propiedades antifúngicas. Experimentalmente SLPI con su estructura intacta exhibe mejores propiedades antibacterianas que sus dominios C-terminal ó N-terminal separados estructuralmente y actuando en forma aislada o conjunta; esto sugiere que existen determinantes estructurales específicos que sólo están disponibles en la molécula completa y que gobiernan su actividad plena[67,68]

Se ha propuesto que las propiedades antimicrobianas de SLPI tienen que ver principalmente con la naturaleza catiónica de sus dominios WAP. El mecanismo por el cual SLPI mata a los microorganismos todavía no se ha esclarecido por completo; sin embargo, la elevada carga positiva de SLPI, podría favorecer el inicio de interacciones con los lípidos aniónicos bacterianos, permitiendo la ruptura de las membranas microbianas[69]. Esto puede afirmarse en base a observaciones en las que altas concentraciones de sal disminuyen significativamente el potencial antimicrobiano de SLPI [67,68].

El dominio N-terminal de SLPI tiene mayor carga positiva que el dominio C-terminal (+7 y +5, respectivamente) y exhibe una mayor actividad microbicida[67]. Sin embargo, sigue siendo poco claro si estas diferencias de carga son los únicos responsables de las marcadas diferencias en las capacidades de ambos dominios para inhibir el crecimiento microbiano.

Las actividades antibacterianas y antifúngicas de SLPI se describen fisiológicamente en varios fluidos corporales, sobre todo en las secreciones de células de las superficies mucosas del cuerpo, donde los niveles de SLPI son particularmente altos[69].

Varios informes han indicado que SLPI puede unirse directamente a las bacterias y ejercer una acción bactericida, como se ejemplifica por su unión a la proteína gonocócica *Opa* (opacidad de la membrana externa). Se vio experimentalmente que gonococos *Opa negativos* fueron resistentes al efecto bactericida de SLPI[70].

Otro mecanismo antimicrobiano empleado por SLPI podría implicar su unión a los ácidos nucleicos bacterianos y consecuente inhibición de la transcripción y/o traducción. SLPI se une al mRNA bacteriano posiblemente a través de interacciones electrostáticas causando toxicidad bacteriana mediante el bloqueo de la síntesis de proteínas[71].

Curiosamente, algunas bacterias desarrollan mecanismos para bloquear la actividad biológica de SLPI. Por ejemplo, algunas cepas muy virulentas de *Streptococcus pyogenes* son capaces de inactivar SLPI a través de *SIC* (inhibidor estreptococcico del complemento). *SIC* inhibe específicamente la actividad antibacteriana de SLPI, pero no afecta a su potencial antiproteasa, y se cree que es el primer inhibidor biológico identificado de la acción bactericida de SLPI[72,73].

Otro ejemplo de bloqueo en la función antibacteriana de SLPI se observó con *Porphyromonas gingivalis* donde la evidencia indica que las proteasas de *P. gingivalis* están implicadas en la degradación proteolítica de SLPI[74].

Nuestro grupo de trabajo, demostró que SLPI es un receptor de reconocimiento de patrones capaz de unirse a la superficie de las micobacterias, haciendo más rápida su fagocitosis por macrófagos[75]

La actividad antiviral de SLPI:

Además de bacterias y hongos, SLPI es activo contra los virus. Puede inhibir in vitro, la infección de monocitos y células T con el *virus de inmunodeficiencia humana tipo 1* (VIH-1)[76,77]. El SLPI, es abundante en la saliva humana, y la inhibición de la infección por VIH-1 en la saliva es en gran parte dependiente de SLPI[78]. El aumento de las concentraciones de SLPI en los fluidos vaginales también se asoció con tasas significativamente reducidas de transmisión perinatal del VIH-1[79]. La actividad antiviral de SLPI no depende de sus propiedades antiproteasa y no es resultado de una interacción directa con el virus del HIV, sino más bien con las células huésped. Probablemente actúa en los primeros pasos de la infección viral que se producen después de la unión del virus a las células y, que preceden a transcripción reversa del genoma viral [76]. Se ha sugerido que la Escramblasa 1, una proteína responsable del movimiento de los fosfolípidos de membrana, podrá desempeñar un papel en el bloqueo de la fusión de virus VIH-1 con la membrana de la célula huésped, evitando así la infección con VIH-1 [48]. Debido a que el mismo dominio citoplásmico de escramblasa 1 interactúa tanto con SLPI como con los receptores de membrana que requiere el virus para su ingreso a la célula (por ejemplo el CD4), se propuso que SLPI podría estar involucrado en la inhibición de la infección por VIH-1 mediante la interrupción de las interacciones entre los receptores de membrana para el virus y la escramblasa 1[77]. Otra proteína de unión de la membrana fosfolipídica y factor de anclaje celular para el VIH-1, es la anexina A2, Esta proteína también sirve para la unión de SLPI sobre la superficie de los macrófagos humanos. La envoltura del virus VIH-1 contiene constituyentes derivados del huésped, como la fosfatidilserina. SLPI puede interferir con la infección de los macrófagos por VIH-1 interfiriendo en la interacción de la fosfatidilserina de la envoltura del VIH-1 en su unión a la anexina A2[47].

A pesar de las potentes propiedades de SLPI anti-VIH-1, ninguna actividad contra otros retrovirus se ha demostrado. Existe escasa información disponible respecto a la actividad antiviral contra otros tipos de virus. In vitro, se demostró la atenuación de la entrada del *virus del papiloma humano* en las células epiteliales a través de la unión de SLPI con anexina 2[80,81] También in vitro, se redujo la infección por *virus herpes simplex* (HSV) mediante la unión de SLPI a la superficie de las células epiteliales[42].

d- SLPI como agente cicatrizal:

La cicatrización es un proceso en cascada que se compone de varias fases: la coagulación sanguínea; la limpieza y esterilización de la herida por células y procesos inflamatorios; el crecimiento y la remodelación tisular. SLPI parece contribuir con todas estas fases. Las primeras pistas de esta función surgieron de un modelo de lesión cutánea al cuál eran sometidos ratones deficientes de SLPI. En ausencia de SLPI hubo un retraso en la

cicatrización de las heridas de la piel que coincidió con excesiva actividad de elastasa local e inflamación prolongada y este efecto era en gran parte reversible con la aplicación de SLPI exógeno[60,82,83].

Este modelo de lesión dérmica también reveló que el SLPI está directamente involucrado en la fase de proliferación de la cicatrización ya que por su acción antiproteasa, protege a los factores de crecimiento de la escisión por las proteasas del medio.

Este mecanismo se describe para la proepitelina (también conocida como progranulina), que es un factor que promueve el crecimiento en su forma intacta, sin escindir; pero que, en forma opuesta, sus fragmentos o “epitelinas” favorecen la infiltración neutrofílica de la herida prolongando la inflamación y evitando la cicatrización. Un vínculo funcional entre la proepitelina y SLPI en la cicatrización de heridas cutáneas fue apoyada por la observación de que a mayor infiltración neutrofílica de una herida, mayor liberación de elastasa neutrofílica y consecuente escisión de proepitelina a epitelinas aumentando el tiempo cicatrizal y, que el agregado de proepitelina recombinante restaura la cicatrización normal de heridas en ratones con deficiencia de SLPI[60].

e- SLPI como regulador de la proliferación celular, la diferenciación y la apoptosis:

SLPI estimula el crecimiento de varios tipos de células epiteliales, así como también de los precursores de células neurales, hematopoyéticas y células B[40,84-86].

SLPI funciona como un factor de promoción del crecimiento en virtud de su capacidad de activar o inhibir la expresión de genes específicos con actividades reguladoras del crecimiento. Los targets de SLPI incluyen a la ciclina D1, que es un regulador de la progresión del ciclo celular; IGFBP-3 (proteína 3 de unión al factor de crecimiento insulina similar) y TGF β , que son supresores de crecimiento; y LOX (lisil oxidasa), que es un supresor tumoral. En un modelo experimental utilizando clones de una línea celular de células derivadas de adenocarcinoma de endometrio que diferían en los niveles de SLPI, se demostró una correlación entre la producción de SLPI y la proliferación. SLPI aumentó directamente la expresión de la ciclina D1 mediante la inducción de la activación de la transcripción del promotor de ciclina D1, mientras que la síntesis de IGFBP-3, TGF β y LOX fueron inhibidas, probablemente a través de un mecanismo indirecto[86]. En consonancia con el potencial de SLPI para regular la proliferación celular y el fenotipo. SLPI también mostró tener un impacto en la diferenciación, proliferación y supervivencia de las células madre neurales (NSC) y precursores de granulocitos. La incubación de NSCs aisladas de la zona subventricular de ratas adultas con SLPI recombinante aumentó la proliferación de estas células, y se asoció con la inducción selectiva de la ciclina D1[41]. Además, en condiciones de diferenciación celular forzados por la transferencia de células a partir de

medio de crecimiento a medio de diferenciación, SLPI favoreció la diferenciación de células madre neurales a oligodendrocitos. Por lo tanto, el SLPI tiene el potencial para apoyar la proliferación y diferenciación NSC[84].

Por otra parte, SLPI controla la apoptosis de granulocitos maduros[87] y otras células mieloides, tales como los monocitos[27]. Aunque el mecanismo subyacente a la inhibición de la apoptosis mediada por SLPI en las células mieloides permanece aún sin ser dilucidado, en células monocíticas U937, tratadas con $TNF\alpha$ para inducir la apoptosis, SLPI ejerce un efecto anti-apoptótico y downregulador de actividad de las caspasas 3 y 7 en paralelo. Estos datos sugieren un bucle de regulación entre estas caspasas efectoras de la muerte celular programada y SLPI. Sin embargo, la inhibición de la apoptosis mediada por SLPI es poco probable que sea una consecuencia directa de SLPI y la interacción con las caspasas, al menos no para la caspasa 3, porque SLPI no es capaz de bloquear la actividad proteolítica de la caspasa 3 en un sistema libre de células. Por otra parte, las formas inactivas para la función antiproteasa de SLPI retienen la capacidad de inhibir la apoptosis inducida por $TNF\alpha$ en células monocíticas, lo que sugiere que SLPI regula la apoptosis de una manera antiproteasa-independiente[27].

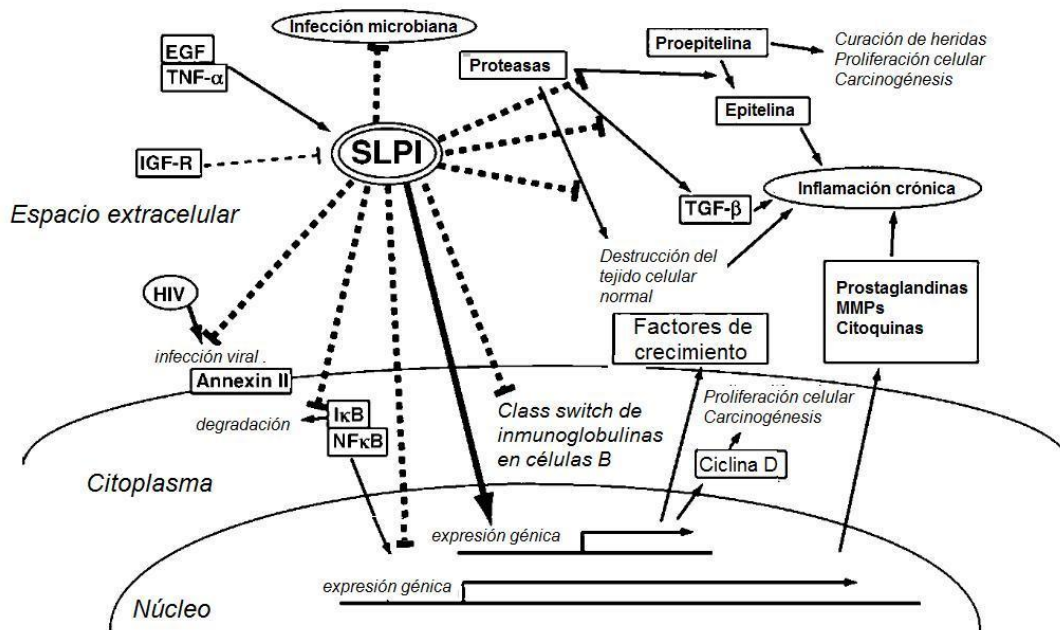
Desde un punto de vista fisiológico, el efecto antiapoptótico de SLPI en los monocitos puede ser importante para la optimización de la eliminación de las células y bacterias que mueren como parte de la inflamación, el proceso de resolución y posterior cicatrización.

A modo de resumen SLPI participa en múltiples instancias homeostasis tisular:

- como un agente antimicrobiano, proporciona una primera línea de defensa contra la infección,
- controla la producción de mediadores inflamatorios y protege al huésped del daño tisular excesivo que generan las enzimas proteolíticas liberadas durante inflamación,
- suprime las respuestas inflamatorias controlando la actividad del factor de transcripción $NF\kappa B$,
- fomenta la reparación y es parte de la maquinaria molecular que controla el crecimiento celular, diferenciación y apoptosis.

De modo que, el resultado neto de las acciones de SLPI es contrarrestar el exceso de respuestas inflamatorias e iniciar los procesos de reparación tisular.

Figura 3 – Síntesis de las principales acciones de SLPI



Dada la variedad de targets biológicos de SLPI y los diferentes mecanismos por los que SLPI ejerce sus acciones, SLPI puede influir en diversos aspectos de la biología celular con resultados que a veces son antagónicos.

OBJETIVOS

El objetivo general de esta tesis de maestría es examinar el rol del SLPI en los pacientes trasplantados renales.

Para esto se establecen siete objetivos específicos:

- 1- Estudiar los niveles de SLPI séricos en los pacientes trasplantados y en sujetos sanos.
- 2-Relacionar los valores séricos de SLPI con los parámetros clínicos y bioquímicos habituales en los pacientes trasplantados.
- 3-Examinar la proliferación leucocitaria en los pacientes trasplantados renales y en sujetos sanos.
- 4-Asociar la proliferación leucocitaria con los parámetros clínicos y bioquímicos habituales en los pacientes trasplantados.
- 5-Correlacionar los valores séricos de SLPI con el índice de proliferación leucocitaria.
- 6-Obtener y purificar SLPI recombinante humana (rhSLPI) para posteriores ensayos in vitro.
- 7-Examinar el efecto del rhSLPI sobre la proliferación leucocitaria en sujetos normales y pacientes trasplantados renales inmunosuprimidos.

HIPOTESIS

Los pacientes trasplantados deben recibir tratamientos inmunosupresores para evitar el rechazo de órganos. Este tratamiento inmunosupresor altera la homeostasis del sistema inmune, en el cual participan múltiples factores y citocinas. Recientemente, en nuestro grupo de trabajo se describió un nuevo mecanismo de homeostasis de la respuesta inmune en donde juega un rol central el SLPI y el IFN γ [88]. En este trabajo de maestría se postula que el SLPI podría tener efectos sobre la respuesta inmune de los pacientes trasplantados, ya que en los mismos se ve alterada su respuesta inmune celular y humoral.

MATERIALES Y METODOS

I- Obtención de SLPI recombinante humano.

1- Expresión de SLPI

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

2- Purificación de SLPI

Los pellets se resuspenden en 2 ml de buffer de lisis (NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 1M, Imidazol 10 mM; pH 8) y se agrega lisozima hasta llegar a una concentración final de 1 mg/ml. También se incorpora DNAsa y RNAsa a una concentración final de 10 $\mu\text{g/ml}$. Se deja actuar a estas enzimas durante 30 minutos. Finalmente las bacterias son lisadas por ultrasonido con 7 pulsos de 60 Watts de 30 segundos de duración en un sonicador. Todo el procedimiento se realiza en hielo para evitar la proteólisis. Luego el lisado se centrifuga a 10.000 g durante 30 minutos a una temperatura de 4°C . La fracción soluble se recupera y se adiciona a 800 μl de resina de Niquel- ácido nitrilotriacético (Ni-NTA), previamente equilibrada en buffer de lisis y se incuba durante 1 hora a 4°C . Durante este tiempo se produce la unión de la cola de 6 histidinas del SLPI al Ni^{+2} complejado de la resina. Posteriormente se realizan dos lavados de 15 ml con una solución NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 1M, Imidazol 20 mM; pH 8 ("buffer lavado 20") luego otros dos lavados con 15 ml de una solución NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 1M, Imidazol 40 mM; pH 8 ("buffer lavado 40") y por último dos lavados de 5 ml con NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 1M, Imidazol 75 mM; pH 8 ("buffer lavado 75"). Finalmente, el SLPI es eluido de la resina por el agregado de 2 ml de una solución NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 300 mM, Imidazol 250 mM; pH 8 ("elusión 250"). La elusión se repite tres veces para obtener el mayor rendimiento posible.

3- Pureza del SLPI

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

4- Diálisis del SLPI y elusión por PolimixinaB

Se utiliza una membrana de diálisis con un tamaño de poro de 10 kDa a la que se le realizan sucesivos lavados. En la bolsa de diálisis se introducen 2-6 ml de SLPI en buffer de "elusión 250" y se deja dializando toda la noche a 4°C en una solución 50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, pH 7,6 y con una concentración de Imidazol que varía según el volumen de SLPI a dializar para obtener al final de la diálisis SLPI en buffer 50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl y 2,5 mM Imidazol a un pH de 7,6. Toda la diálisis se realiza con material previamente esterilizado. Luego la muestra con SLPI se eluye por columna de polimixina B - Agarosa (*Sigma*, St. Louis, MO, USA) para eliminar restos de LPS. Los niveles de LPS fueron evaluados usando el test de Limulus (*Pyrotell – Associates of Cape Cod*, Falmouth, MA, USA).

5- Actividad anti-serinoproteasa

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

nm cada 2 minutos durante 20 minutos. El SLPI generado tuvo la capacidad para inhibir la acción de la tripsina en los ensayos de actividad inhibitoria.

6- Cuantificación de la concentración de proteína

Se construye una curva de calibración con diluciones seriadas de BSA (0-250 µg/ml) en buffer "elusión 250" o en buffer de diálisis. En microplacas de 96 pozos (fondo plano) se coloca 50 µl de las diluciones de BSA y las distintas muestras de SLPI. Luego se agregan 50 µl de la solución obtenida con 50 partes del reactivo A, 48 partes de B y 2 partes de C del Kit de MicroBCA (Pierce, USA). La placa se incuba durante una hora a 37° C después de lo cual se lee a 550 nm en el lector de ELISA. Se grafica una curva de concentración en función de la densidad óptica. Finalmente, se obtiene el valor de la concentración de SLPI calculando la pendiente y la ordenada de origen de la curva como $[SLPI] = (DO_{550} \text{ mm de SLPI-B}) / \text{pendiente}$. Como producto final de las distintas purificaciones realizadas se obtuvo SLPI en concentraciones que variaron entre 40 y 200 µg/ml diluidas en buffer 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 2,5 mM Imidazol y pH de 7,6.

II- Obtención de células y medios condicionados.

1- Individuos y Pacientes:

Se utilizó sangre (15 ml) de donantes sanos que previamente firmaron un consentimiento y los remanentes de sangre de estudios de rutina que habitualmente se les realiza a los pacientes en el pre-trasplante y en el post-trasplante. Estos pacientes forman parte de un estudio mucho mayor que tiene la aprobación del comité de ética de la Fundación Favaloro.

Criterios de inclusión:

Pacientes sin distinción de género cuyos datos filiatorios y de histocompatibilidad estuviesen registrados en el SINTRA, en situación pretrasplante y en lista de espera para trasplante; en post-trasplante renal, con alta hospitalaria y en seguimiento ambulatorio clínico-laboratorial habitual que fueron receptores de injertos renales de donantes cadavéricos o vivos, en tratamiento inmunosupresor constatable por la medición de los niveles séricos de dichas droga.

Criterios de exclusión:

Pacientes en edad pediátrica (menores a 15 años de edad).

Pacientes con trasplantes multiorgánicos.

Pacientes trasplantados fuera del territorio Nacional sin cumplir con los criterios reglamentarios para la Ley de Trasplantes de la República Argentina.

No adherencia manifiesta al tratamiento inmunosupresor.

2- Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (CMSP)

A partir de sangre periférica anticoagulada con ACD se hizo una dilución al medio en solución fisiológica de la misma y se colocó sobre un gradiente de Ficoll-Paque™ PLUS (GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, UI, Suecia) (densidad = 1,077 g/cm³). Luego las células fueron centrifugas a 2000 r.p.m. por 20 minutos. Se obtuvieron las células mononucleares levantando el halo formado en la interfase. Luego se realizaron 3 lavados con solución fisiológica centrifugando a 1200 r.p.m. por 10 minutos. Por último, las células se resuspendieron en medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco, Grand Island, NY, USA) conteniendo L-glutamina (2 mM), gentamicina (40 µg/ml) y 10 % de suero bovino fetal decomplementado (Gibco, Grand Island, NY, USA).

III. Cultivos Celulares

1- Ensayos de proliferación celular

En una placa de cultivo de 96 pocillos de fondo en U se colocaron 1x10⁵ CMSP resuspendidas en medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco, Grand Island, NY, USA), suplementado con 10 % de suero bovino fetal decomplementado (SBF) (Gibco, Grand Island, NY, USA), L-glutamina (2mM) y gentamicina (40 µg/ml).

La proliferación fue inducida por PHA (4 ul/well) en presencia o ausencia de SLPI, durante 4 días, a 37 °C con 5 % CO₂. Al 5to día se colocó timidina tritiada, cosechándose las células y realizando la lectura de la radioactividad con un contador de centelleo líquido (Wallac 1214 Rackbeta, Turku, WF, Finlandia). Los resultados se expresan como índice de proliferación (cpm basal/cpm PHA * 100).

2- Determinación de niveles de SLPI séricas de individuos estudiados (controles sanos, en el pre-trasplante y en el post-trasplante)

ELISA para estudiar los niveles de SLPI

El nivel de SLPI plasmático se determinó utilizando un ELISA sándwich. Primero se adhirió un anticuerpo monoclonal de ratón anti-SLPI humano (IgG1, 1 µg/ml) (Hbt, Uden, North Brabant, Holanda) a la superficie de las placas de 96 pocillos (de alta unión a péptidos) en PBS por 16 hs a 4 °C. Luego se descartó el medio y sin lavar se bloqueó la placa con BSA

0,5 % - Leche 1 % en PBS (1hr, 37°C). La placa luego fue lavada con PBS-Tween-20 (0,05 % - 0,1 %) 5 veces y después se incorporaron las muestras de plasma (1h, 37 °C). Se lavó 3 veces con PBS - Tween-20 (0,05 % - 0,1 %) y se agregó el segundo anticuerpo policlonal de conejo anti-SLPI humano (0,14 µg/ml), (Hbt, Uden, North Brabant, Holanda) en BSA 0,5% - Leche1% -PBS (90 min, 37 °C). Se repitió el lavado 5 veces y se adicionó para revelado el anticuerpo policlonal de cabra anti - IgG de conejo conjugado a peroxidasa (1:1200) en BSA 0,5% - Leche1% - PBS (1hr, 37 °C). Finalmente se reveló utilizando 3,3',5,5' tetrametibenzidina (TMB, Sigma, St. Louis, MO, USA) y la reacción se detuvo con una solución de H₂SO₄ 1 N. Las absorbancias fueron determinadas por lectura a 450 nm en lector de placas de ELISA (Labsystems Multiskan, Londres, Inglaterra, Reino Unido). La curva estándar fue realizada a partir de SLPI producido y purificado en nuestro laboratorio.

3- Obtención de monocitos

Los monocitos se obtuvieron a partir de sangre periférica humana de donantes sanos, a través de un gradiente de la siguiente manera: Cincuenta mililitros de sangre entera se diluyeron al medio en solución fisiológica para luego proceder a la obtención de las células mononucleares. Para esto la sangre así diluida se depositó suavemente sobre un gradiente de Ficoll-PaqueTM PLUS (*GE Healthcare Bio-Sciences*, Uppsala, UI, Suecia) (densidad = 1,077 g/cm³) en tubos cónicos de 50 ml (10 ml de Ficoll-Paque + 40 ml de sangre). Luego se centrifugó durante 20 minutos a 2000 r.p.m. a temperatura ambiente en una centrífuga Sorvall y se tomó cuidadosamente la banda correspondiente a las células mononucleares con pipeta pasteur. Sobre dichas células, posteriormente, se realizaron dos lavados con solución fisiológica. El pellet de las células mononucleares obtenido se resuspendió en 2 ml de buffer T1 (Tyrode), 0,8 % EDTA, 0,9 % NaCl y 5 % de suero bovino fetal de complementado (SBF) (*Gibco*, Grand Island, NY, USA) y se procedió al agregado secuencial de 8 µl de una solución de NaCl 9 % cada 10 min, tres veces. Este procedimiento modifica principalmente, y de manera reversible, la densidad de los monocitos, pero no la de los linfocitos, para facilitar la posterior separación en gradiente de Percoll. Posteriormente se arma un gradiente discontinuo de Percoll (*Pharmacia Fine Chemicals*, Dorsal, PQ, Suecia) en tubos cónicos de 15 ml con bandas de diferente densidad: 40 %, 45 %, 50 % y 56 % de Percoll; la banda correspondiente a 50 % de Percoll se mezcló previamente con la solución de células mononucleares tratadas con solución de NaCl. El gradiente así formado se centrifugó durante 15 minutos a 1600 r.p.m. Los monocitos se recuperaron de la zona entre las bandas correspondientes a 45 % y 50 % de Percoll. Las células se lavaron con solución fisiológica centrifugando a 1300 r.p.m. por 8 minutos. El recuento de monocitos al microscopio y la verificación de la purificación se realizaron utilizando un colorante que tiñe en forma diferencial monocitos, como es el rojo

neutro (*Sigma*, St. Louis, MO, USA). Los monocitos así obtenidos se cultivaron en RPMI 1640 (*Gibco*, Grand Island, NY, USA), suplementado con 10% de suero bovino fetal decomplementado (SBF) (*Gibco*, Grand Island, NY, USA) inactivado, L-glutamina (2mM) y gentamicina (40 µg/ml) a 37 °C en estufa con 5% CO₂.

4- Apoptosis de células tubulares renales (HK-2)

La línea de células tubulares renales HK-2, fueron crecidas en RPMI1640+10%SBF. La apoptosis fue inducida por el tratamiento con 1 mM dexametasona durante 24 hs. La apoptosis de las células HK-2 fue verificada utilizando un kit comercial Anexina V-FITC (BD Pharmingen™, San Diego, CA, USA) siguiendo el protocolo del fabricante. La apoptosis fue examinada utilizando un equipo FACSCalibur (Becton Dickinson-BD, San José, CA, USA) y los resultados obtenidos se analizaron con el programa WinMDI para Windows versión 2.9. Para los experimentos de inducción de SLPI por monocitos/macrófagos, sólo se utilizaron las células que mostraron una apoptosis superior al 80 %. En algunos experimentos, estas células apoptóticas fueron co-cultivadas junto a monocitos/macrófagos durante 48 horas, y al finalizar se recoge el sobrenadante libre de células, donde se procedió a medir el SLPI utilizando un ensayo de sándwich ELISA, tal como se describe en otra parte de esta sección.

5- Análisis estadístico.

El análisis estadístico de los datos se realizó mediante el análisis de la varianza (ANOVA) y ajustando los niveles de significación de los contrastes incluidos utilizando el método de Sidak que ofrece límites más estrechos que los de la aproximación de Bonferroni. En algunos casos, para la comparación entre medias se utilizaron prueba t de Student, prueba de Mann-Whitney-Wilcoxon, y para las medianas la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon, según se indica en la leyenda de las figuras. Para las correlaciones paramétricas y no paramétricas se utilizó el coeficiente de correlación de Spearman y la prueba χ^2 de Pearson. Se consideró como significativo un valor de $p < 0,05$ (*), y como altamente significativo un valor de $p < 0,001$ (**), y $p < 0,0001$ (***)

RESULTADOS

I- SLPI sérico

Trabajos previos en nuestro laboratorio mostraron que los pacientes con tuberculosis presentan mayores niveles séricos de SLPI, encontrándose los mayores valores en aquellos pacientes con enfermedad más severa[88]. En este trabajo quisimos evaluar los niveles séricos de SLPI en los pacientes trasplantados. Para esta parte del estudio, se reclutaron 103 pacientes trasplantados renales o renopancreáticos (44 mujeres y 59 hombres, entre 16 y 82 años), 25 pacientes en lista de espera pre-trasplante (12 mujeres y 13 hombres, entre 28 y 79 años) y 14 individuos sanos (6 mujeres y 8 hombres, entre 25 y 59 años). La determinación de SLPI se realizó a través de un ELISA sándwich y los resultados mostraron que los pacientes en lista de espera y los pacientes trasplantados presentaban niveles significativamente mayores con respecto a los individuos sanos. De hecho, también se pudo observar que los pacientes trasplantados presentaban menores niveles séricos de SLPI comparados con los individuos en el pre-trasplante.

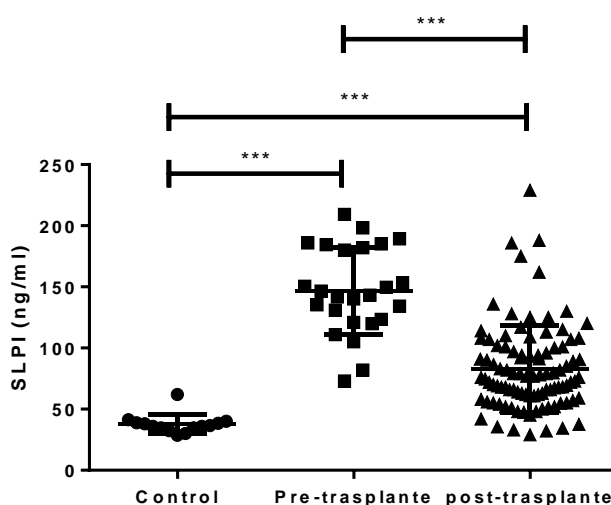


Figura 4. Niveles séricos de SLPI en pacientes trasplantados, individuos sanos y en el pre-trasplante. ANOVA, Sidak's multiple comparisons test; *** $p < 0.0001$.

Dada la disparidad en la edad de los individuos reclutados y conociendo que los niveles de SLPI salivales disminuyen a medida que envejecemos[89], decidimos normalizar los valores de SLPI en función de la edad. En la Figura 5, se observa que al normalizar los valores en función de la edad, las diferencias entre los grupos comparados se sigue manteniendo, evidenciándose que luego del trasplante los valores disminuyen pero no llegan a los valores que presentan los individuos sanos.

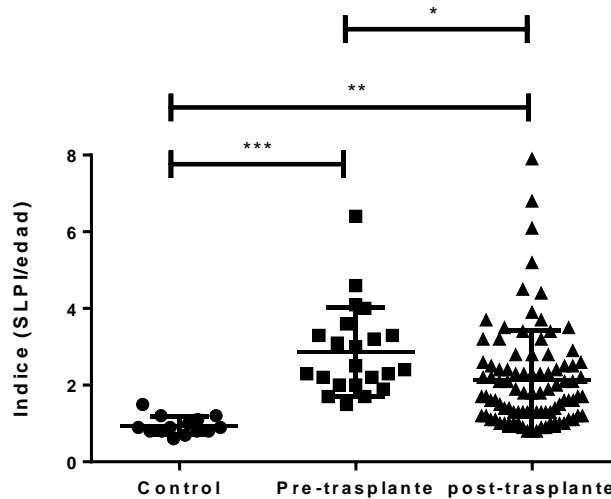


Figura 5. Niveles séricos de SLPI en función de la edad en pacientes trasplantados, individuos sanos y en el pre-trasplante. ANOVA, Sidak's multiple comparisons test; * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$; *** $p < 0.0001$.

Luego se examinan la posible existencia de diferencias entre los hombres y las mujeres con respecto a los niveles séricos de SLPI o el índice SLPI/edad. En la Figura 6 se muestra que no existen diferencias en ambos parámetros analizados entre los hombres y las mujeres trasplantadas.

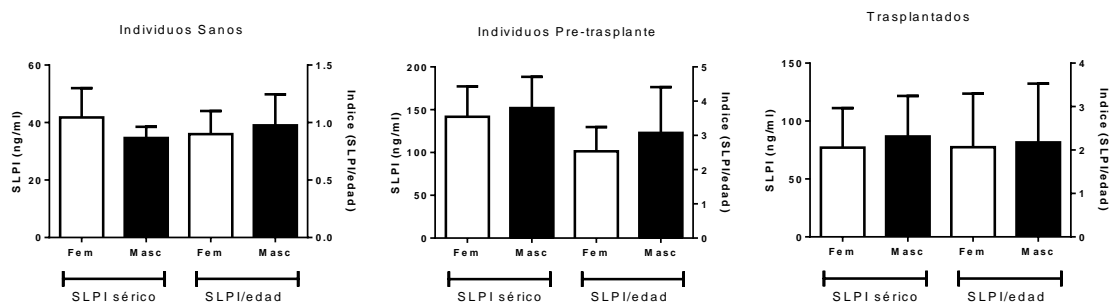


Figura 6. Niveles séricos de SLPI y SLPI/edad en función del género en individuos sanos, en pacientes en pre-trasplante y pacientes trasplantados.

Con el pase de la terapia inmunosupresora de inducción a la de mantenimiento, disminuye el estado de inmunosupresión sin poner en riesgo la viabilidad del injerto, ya que disminuyen los niveles séricos de las drogas, como así también los efectos tóxicos de las mismas sobre el injerto. Por esta razón, quisimos examinar si los valores séricos de SLPI se podrían estar modificando a medida que transcurre el tiempo desde la cirugía. En la Figura 7, se puede observar que existe una tendencia a disminuir los niveles de SLPI séricos o del

índice SLPI/edad en función del tiempo post-trasplante. Estos resultados, sugieren que el SLPI es un valor muy sensible a la injuria y/o a la terapia inmunosupresora de mantenimiento.

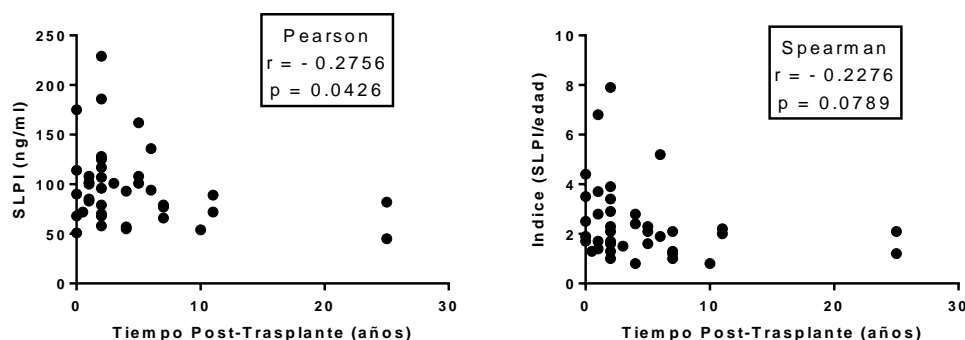


Figura 7. Correlación entre SLPI o SLPI/edad y Tiempo post-trasplante.

Con el tiempo post-trasplante, también se van modificando los niveles de creatinina, urea y filtrado glomerular. Por lo tanto, se examinó la existencia de correlaciones entre los niveles de SLPI y los parámetros mencionados más arriba. En la Figura 8 se muestran una correlación directa entre los niveles séricos de SLPI y la creatinina y la urea sérica. Por el contrario, se puede ver una correlación inversa entre SLPI y MDRD (indicador de filtrado glomerular), sugiriendo que el SLPI podría ser un indicador de daño renal como fuera sugerido por otros autores[20]. Resultados similares se obtuvieron con SLPI/edad, aunque estos no fueron estadísticamente significativos.

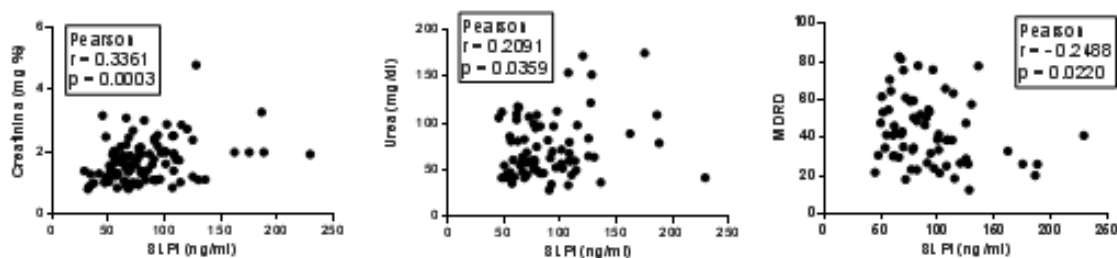


Figura 8. Correlación entre SLPI sérico y creatininemia, uremia y MDRD*.

* Estimación del filtrado glomerular según la ecuación del estudio MDRD ("Modification of Diet in Renal Disease") que consiste en $FG \text{ estimado (mL/min/1,73m}^2) = 186 \times (\text{creatinina})^{-1,154} \times (\text{edad})^{-0,203} \times (0,742 \text{ si mujer}) \times (1,210 \text{ si raza negra})$

En un intento por establecer como repercuten los diferentes tratamientos inmunosupresores sobre los niveles de SLPI, los pacientes fueron agrupados en dos grupos según su esquema inmunosupresor de mantenimiento, estableciéndose el grupo 1 a aquellos pacientes que recibieron esteroides + MMF + tacrolimus (68 pacientes) y el grupo 2 recibieron esteroides + MMF + rapamicina (20 pacientes). En la Figura 9(A) se observa que aquellos pacientes que reciben esteroides + MMF + rapamicina presentan niveles de SLPI significativamente mayores comparados con los pacientes que reciben esteroides + MMF + tacrolimus.

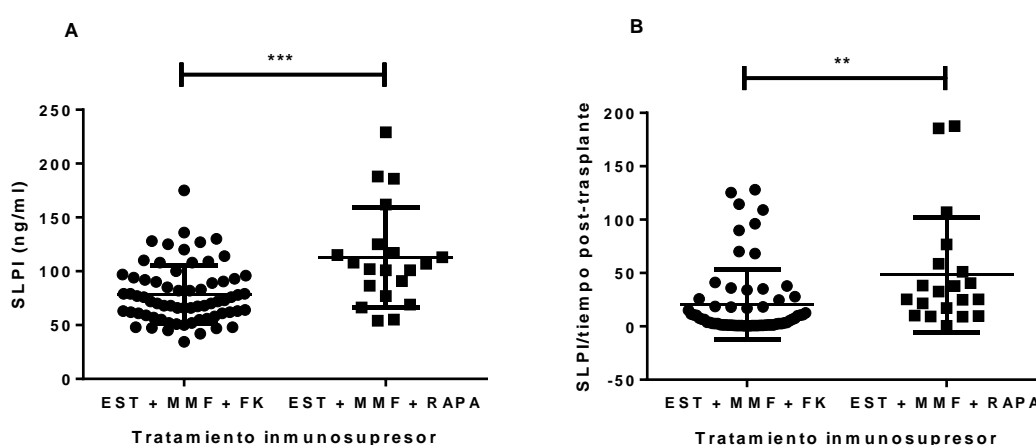


Figura 9. Efecto del tratamiento inmunosupresor de mantenimiento sobre los niveles de SLPI sérico. En A se grafican los niveles de SLPI y en B se grafican los niveles de SLPI en función del tiempo post-trasplante. *** $p < 0.0001$ y $p < 0.001$, Student t test. EST: esteroides (meprednisona); MMF: micofenolato mofetil; FK-506 (tacrolimus); RAPA: rapamicina.

Teniendo en cuenta que estos valores de SLPI se modifican en base al tiempo post-trasplante, y en un intento de descartar el factor tiempo, como resultante de la diferencia hallada, se obtuvo un índice SLPI/tiempo post-trasplante y nuevamente se compararon ambos tratamientos descritos más arriba. En la Figura 9B se observa que aún normalizando los valores de SLPI sérico en base al tiempo post-trasplante, se sigue manteniendo las diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes trasplantados e inmunosuprimidos con esteroides + MMF + tacrolimus y los pacientes tratados con esteroides + MMF + rapamicina. Estos resultados sugieren que la inhibición de mTOR favorece la expresión de SLPI.

Con la intención de verificar este fenómeno, posteriormente se aislaron monocitos de los pacientes tratados con esteroides + MMF + tacrolimus o rapamicina. Luego se procedió a

incubar los monocitos junto con células apoptóticas, siendo estas últimas un estímulo inductor de SLPI[33]. En la Figura 10, se observa que la incubación de monocitos con células apoptóticas (células HK-2 tratadas con dexametasona), indujo la producción de SLPI en el sobrenadante de cultivo de las células.

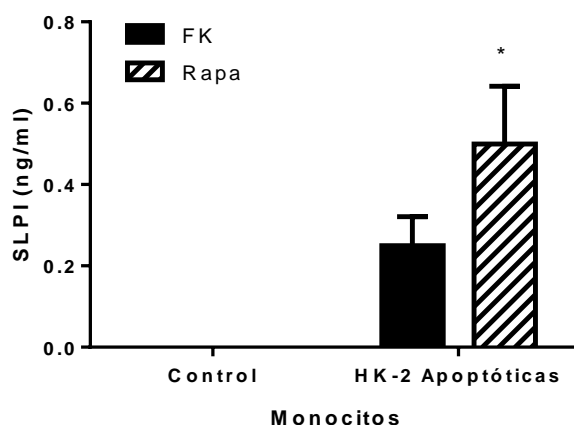


Figura 10. Producción de SLPI por monocitos derivados de pacientes inmunosuprimidos. Los monocitos de pacientes inmunosuprimidos fueron aislados de PBMC por adhesión en placa durante 24 horas. Posteriormente se lavan y se coloca una línea de células tubulares renales apoptóticas (HK-2). Se representa la media \pm SD de un experimento representativo de dos. $P < 0.05$.

Estos resultados confirman que la producción de SLPI, en parte es modulada por la expresión de mTOR.

II- Proliferación leucocitaria

Una vez obtenido el SLPI recombinante humano tal como se describe en materiales y métodos, se procedió a realizar los experimentos de proliferación leucocitaria inducidos por un mitógeno (PHA) en presencia de 4 μ g/ml rhSLPI. Luego de 5 días de incubación, a las células se les colocó timidina tritiada y 16 horas más tarde las células fueron cosechadas, examinándose la proliferación celular por incorporación del radioactivo. En la Figura 11 se observa que el PHA indujo la proliferación linfocitaria tanto en individuos sanos como en pacientes trasplantados. Los niveles de proliferación fueron muy variables dentro de cada grupo. Sin embargo, se pudo observar que los pacientes trasplantados e inmunosuprimidos presentaban niveles de proliferación menores que los individuos sanos.

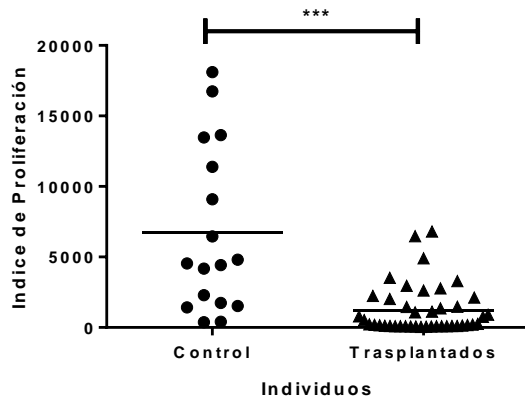


Figura 11. Índice de proliferación leucocitaria. PBMC fueron cultivados durante 5 días en presencia o ausencia de PHA. Los resultados se expresan como índice de proliferación, siendo el índice $(\text{cpm PHA} / \text{cpm basal}) * 100$. $P < 0.0001$ Mann Whitney test.

Además, en los pacientes trasplantados, los niveles de proliferación se correlacionaron de manera directa con el tiempo post-trasplante, indicando que cuanto mayor era el tiempo post-trasplante respondían mejor al estímulo proliferativo (Figura 12). Estos resultados son opuestos a los ya descritos al SLPI sérico, en donde observamos que existe una correlación inversa en SLPI endógeno y tiempo post-trasplante (Figura 7 de SLPI). En la misma figura también se observa que la mayor dispersión de los valores ocurre en los primeros meses post-trasplante. Este resultado es lógico teniendo en cuenta que estos pacientes reciben un tratamiento de inducción y deben recuperar un nuevo nivel homeostático de su respuesta inmune, el cual se logra habitualmente a partir del 6to mes de trasplante.

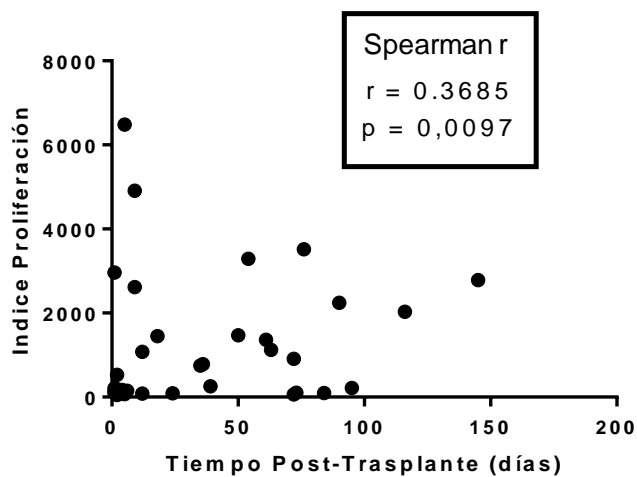


Figura 12. Índice de proliferación leucocitaria en función del tiempo de post-trasplante. PBMC fueron cultivados durante 5 días en presencia o ausencia de PHA. Los resultados se expresan como índice de proliferación, siendo el índice $(\text{cpm PHA} / \text{cpm basal}) * 100$.

El siguiente paso fue analizar asociaciones entre los parámetros clínicos y el índice de proliferación. Como se observa en la Figura 13, existe una correlación directa entre la proliferación y los valores de urea en plasma, no así con la creatininemia (no mostrado). Resulto interesante, además observar una correlación inversa entre el índice de proliferación y los valores de MDRD, indicando que a menor filtrado glomerular existe un mayor índice de proliferación. Estos resultados están de acuerdo en cuanto a que una mayor actividad inmune puede repercutir de manera perjudicial en el estado funcional del injerto.

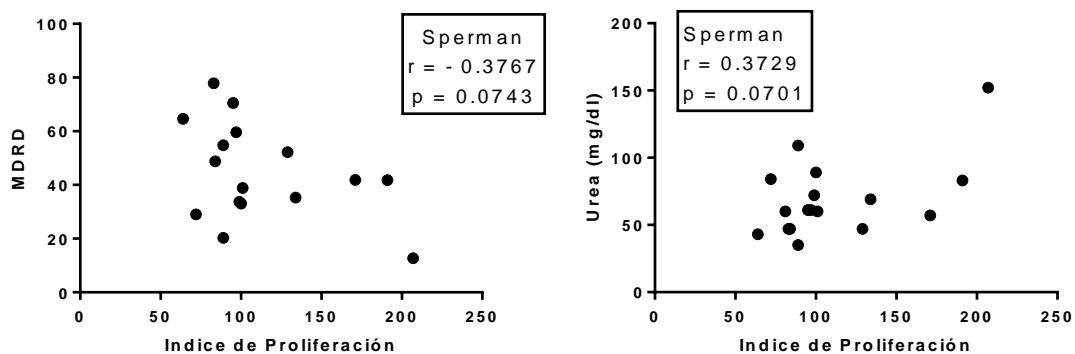


Figura 13. Índice de proliferación leucocitaria en función de la urea y el MDRD.

En resultados previos de nuestro laboratorio describimos que el SLPI tiene un efecto inhibitorio sobre la proliferación leucocitaria. En un intento de determinar si esa inhibición también era efectiva en los pacientes trasplantados, se procedió a analizar el efecto del agregado de SLPI sobre la proliferación leucocitaria inducida por PHA. Como ya fuera descrito[90], el agregado de SLPI inhibió la proliferación de leucocitos en el grupo control (Figura 14). En los pacientes trasplantados, el SLPI también fue capaz de inhibir la proliferación. Sin embargo, la magnitud de la inhibición fue menor comparado con los individuos sanos (Figura 14).

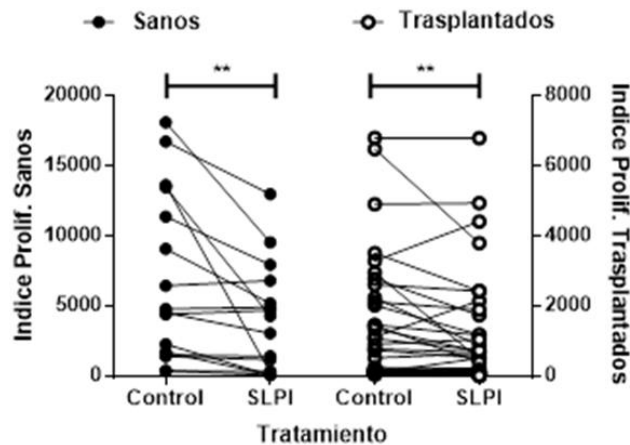


Figura 14. Índice de proliferación leucocitaria en presencia de SLPIrh. Las PBMC de individuos sanos o pacientes trasplantados fueron incubadas con PHA y en presencia o ausencia de SLPI. La proliferación fue medida por incorporación de timidina tritiada al 5to día. Wilcoxon matched-pairs signed rank test, $p < 0.001$.

Al igual que para la proliferación, el porcentaje de inhibición de SLPIrh también se correlacionó con el tiempo post-trasplante, indicando que a mayor tiempo post-trasplante mayor es el porcentaje de inhibición (Figura 15).

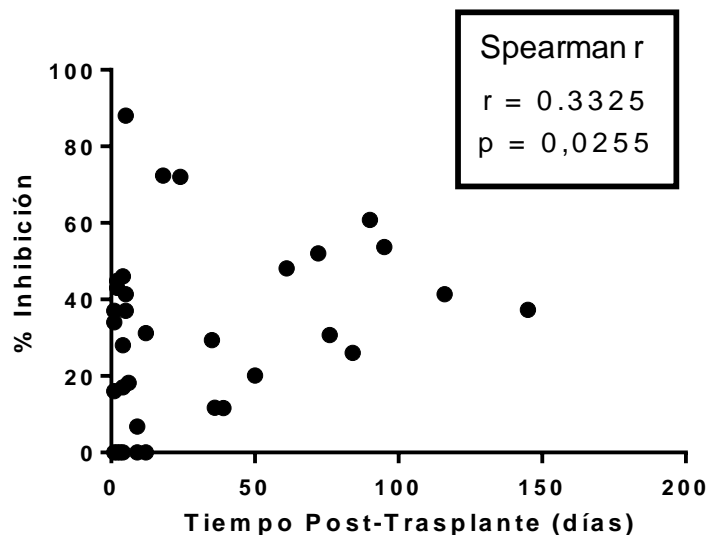


Figura 15. Porcentaje de Inhibición de SLPIrh sobre la proliferación leucocitaria en función del tiempo post-trasplante. Las PBMC de pacientes trasplantados fueron incubadas con PHA y en presencia de SLPI. La proliferación fue medida por incorporación de timidina tritiada al 5to día. El % de inhibición se calcula con la siguiente fórmula: $[(\text{Proliferación PHA} - \text{Proliferación PHA+SLPI}) / (\text{Proliferación PHA})] * 100$.

En conjunto estos resultados indican que las PBMC son sensibles a la acción inhibitoria del SLPI.

III- SLPI y Proliferación leucocitaria

Por último estudiamos una posible asociación entre los niveles de SLPI séricos y la respuesta proliferativa in vitro. Esta asociación podría inferirse en base a la correlación inversa y directa observada entre el tiempo post-trasplante con el SLPI sérico y con el índice de proliferación, respectivamente.

En la Figura 16, se puede observar que a mayor nivel sérico de SLPI existe una menor respuesta proliferativa frente al mitógeno PHA.

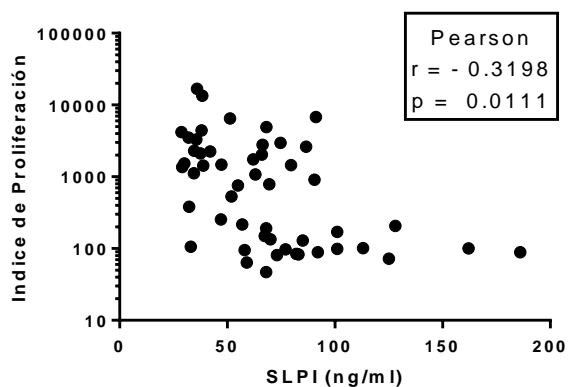


Figura 16. Índice de proliferación y niveles SLPI sérico en pacientes trasplantados

En conjunto estos resultados nos sugieren una función del SLPI endógeno que tiene una repercusión en la respuesta inmune proliferativa.

DISCUSION

Los trasplantes de órganos y tejidos son una herramienta terapéutica que ha permitido mejorar la calidad de vida de muchos pacientes. La utilización de nuevas drogas inmunosupresoras han logrado incrementar notablemente la supervivencia del injerto, evitando o reduciendo principalmente el rechazo agudo. Sin embargo, la supervivencia del injerto y de los pacientes a largo plazo, no fue sustancialmente modificada con la introducción de los nuevos tratamientos. Esto se debe principalmente a los efectos secundarios, en particular efectos tóxicos, infecciones y neoplasias asociados con el uso a largo plazo de estos fármacos [91,92]. Claramente los dos objetivos de las terapias inmunosupresoras (prevención del rechazo y evitar las infecciones y los procesos tumorales) están en continua oposición, por ello las dosis de inmunosupresores deben estar equilibradas para obtener resultados óptimos de modo que eviten el rechazo pero que a la vez minimicen el riesgo de infección. Es por esto que se ha tratado de manera infructuosa de buscar biomarcadores del estado inmunológico. Se han utilizado diferentes estrategias, como proteómica, metabolómica, y fuentes (suero, orina, biopsias renales) [93]. Sin embargo, ninguna de ellas llegó a ser utilizada en la clínica excepto un kit denominado Immuknow Assay (Viracor-IBT Laboratories), que tuvo amplia repercusión y aceptación, pero que pronto fue también descartado por su baja especificidad [94]. Es por ello que en la actualidad se siguen dosando los niveles séricos de los inmunosupresores como medida del estado de inmunosupresión de los pacientes, a pesar de las limitaciones que tienen este tipo de estrategias[95,96]. El número creciente de trasplantes de órganos sólidos, la incapacidad de evitar el rechazo crónico, la creciente utilización de donantes con criterios expandidos en trasplante renal, y fundamentalmente los efectos adversos de los tratamientos inmunosupresores, son algunas de las razones que nos llevan a continuar con la búsqueda de biomarcadores del estado inmunológico.

Durante años, en el laboratorio de inmunomoduladores del CEFYBO, han venido trabajando con un inhibidor de serinoproteasas denominado SLPI. Tal como fuera descrito en la introducción, el SLPI tiene actividad inmunomoduladora, habiéndose descrito su capacidad para reducir el daño en un modelo de orquitis autoinmune y artritis reumatoidea [97,98], junto con un efecto inhibitor sobre la proliferación linfocitaria [90]. También, recientemente se describió un eje SLPI-IFN γ autoregulatorio en los niveles de SLPI e IFN γ , que es funcional en los individuos sanos, no así en los pacientes con tuberculosis [88]. De hecho, en los tuberculosos se observan niveles séricos elevados de SLPI, que son aún mayores con la progresión de la enfermedad [88].

Dado que los niveles de IFN γ pueden modificarse en los pacientes trasplantados, ya sea por infección o por rechazo, nos pareció interesante examinar los niveles séricos de SLPI en los pacientes trasplantados renales estables. Es por esto, que en este trabajo de tesis examinamos inicialmente los niveles séricos de SLPI. Para cumplir con este objetivo, decidimos evaluar los niveles séricos de SLPI en los pacientes trasplantados, comparándolos con un grupo de individuos sanos y con los pacientes en el pretrasplante, es decir que están en lista de espera para un trasplante. Resultó interesante, observar que los pacientes en el pre-trasplante presentan niveles significativamente elevados con respecto a los individuos sanos. Este dato, que en principio fue inesperado, podría justificarse por la enfermedad de base de los pacientes que están con enfermedad renal terminal y que requieren de tratamiento hemodialítico crónico. De hecho, también se sabe que la enfermedad renal crónica y la hemodiálisis tienen un efecto inflamatorio muy importante [99] [100]. Es por esto, que es muy factible que los niveles elevados de SLPI en los pacientes en lista de espera, se deban al estado inflamatorio causado por la enfermedad de base o la hemodiálisis crónica. Cabe señalar que SLPI es una alarmina, que se eleva ante procesos inflamatorios [101]. Además, es importante recordar que el SLPI ha sido propuesto como un marcador de daño agudo renal, con lo cual podríamos especular que estos niveles elevados en el pre-trasplante podrían deberse a ese daño renal [20]. Por otro lado, nosotros observamos que existe una correlación entre SLPI y los marcadores daño renal utilizados en la práctica clínica habitual (aumento de uremia y creatininemia con disminución del filtrado glomerular estimado por MDRD), confirmando la idea de que el SLPI puede ser un buen marcador de función renal.

Los niveles séricos elevados de SLPI en los pacientes en el pre-trasplante tienden a disminuir en el pos-trasplante, y esto podría deberse a un mejoramiento de su estado general y/o a una reducción de su estado inflamatorio. De todas maneras, estos niveles siguen elevados con respecto a los individuos sanos. Aún así, los niveles van disminuyendo a medida que nos alejamos del día del trasplante, indicando una recuperación y estabilidad de la función renal en los pacientes trasplantados.

Existen muchas variables que pueden impactar sobre los niveles de SLPI, como por ejemplo el sexo y la edad. En el primer caso, nosotros no observamos diferencias entre los niveles de SLPI entre los hombres y mujeres, en ninguno de los grupos examinados. Con respecto a la edad, sabemos que los niveles salivales de SLPI disminuyen a partir de los 45-50 años[89]. Es por esto que otra manera de análisis de nuestros resultados fue considerando la edad de los individuos. Con este modo de análisis (SLPI sérico/edad), las diferencias observadas utilizando como parámetro los niveles séricos de SLPI, se mantuvieron.

El tratamiento inmunosupresor en el trasplante renal frecuentemente se basa en una triple terapia, que incluye el uso de inhibidores de calcineurina (ICN), drogas que deben ser monitoreadas en sus niveles séricos a fin de evitar sus potenciales efectos tóxicos, particularmente sobre las nefronas del injerto renal.

El tratamiento inmunosupresor con varias drogas busca sinergia de efectos inmunosupresores y un rango de efectos adversos y/o tóxicos no superpuestos. No es infrecuente que durante el tratamiento inmunosupresor existan situaciones que lleven a rotar estos tratamientos en pos de evitar el rechazo y mantener la funcionalidad del injerto por más tiempo. Una de las causas que llevan a la conversión ICN a inhibidores de mTOR (mTORi) es la toxicidad renal que generan los ICN[18,102]. Cuando se comparan los pacientes con los dos esquemas de inmunosupresión de mantenimiento más estandarizados en la práctica clínica: esteroides + micofenolato + tacrolimus vs esteroides + micofenolato + rapamicina (sirolimus o everolimus) se vio que aquellos pacientes con inhibidores de mTOR (rapamicina) tenían niveles séricos de SLPI mayores. Para corroborar que los niveles de SLPI podrían estar influenciados por la actividad de la kinasa mTOR, desarrollamos experimentos *in vitro* exponiendo a los monocitos de los pacientes inmunosuprimidos con mTORi o con ICN, a un estímulo bien conocido inductor de SLPI, como son los timocitos apoptóticos [33]. En nuestro caso, se decidió utilizar células tubulares renales apoptóticas, en lugar de timocitos apoptóticos, con el objeto de remedar lo máximo posible, la fisiopatología del paciente trasplantado renal. Estos experimentos arrojaron resultados que claramente nos indican que los monocitos de los pacientes trasplantados e inmunosuprimidos son capaces de producir y liberar SLPI en respuesta a células apoptóticas renales, siendo mayor su producción cuando esta inhibida la vía de mTOR. Este es el primer trabajo que señala que la vía de mTOR está vinculada a la producción de SLPI. Teniendo en cuenta, que se requiere la vía de mTOR para la producción de citocinas inflamatorias, como por ejemplo $IFN\gamma$, y sabiendo que $IFN\gamma$ es capaz de inhibir SLPI, es probable que el aumento observado en el suero de los pacientes trasplantados e inmunosuprimidos con mTORi, se deba a la menor producción de $IFN\gamma$. Resultados preliminares del grupo de trabajo, indican que estos pacientes tienen menor producción de $IFN\gamma$, avalando esta hipótesis.

Los ensayos de proliferación *in vitro* realizados con PBMC en presencia de PHA muestran que el grupo de pacientes trasplantados renales, independientemente de su esquema inmunosupresor tiene una disminución significativa de su capacidad de proliferar frente a un potente estímulo como lo es el mitógeno PHA y que cuando se introduce la variable “tiempo post-trasplante” al análisis, a mayor tiempo post-trasplante existe una mayor proliferación. Estos resultados son lógicos debido a la presencia de los inmunosupresores, y nos hace

pensar que la terapia inmunosupresora, condiciona la reconstitución inmune, entendida como capacidad proliferativa. Esta observación resultó de nuestro interés y consideramos en futuros ensayos la posibilidad de ampliar el número de pacientes analizado para establecer con mayor fidelidad esta aseveración.

Por otro lado, en estos ensayos de proliferación se pudo observar un dato de sumo interés clínico, ya que los pacientes que presentaron una mayor capacidad proliferativa mostraron una menor función renal (Figura 13). Probablemente esto este indicando que los pacientes que tienen mayor inmunosupresión tengan menores probabilidades de eventos de rechazos (subclínicos) que deterioren la función renal; siempre y cuando la concentración de los inmunosupresores en sangre periférica se encuentre en los rangos terapéuticos, tal como los que presentaban estos pacientes (dato no mostrado).

El SLPI es una molécula anti-inflamatoria e inmunomoduladora como ya fue mencionado más arriba. Su capacidad de inhibir la proliferación leucocitaria in vitro, fue puesta a consideración en los pacientes trasplantados, dado que existían antecedentes que indicaban que este efecto puede no observarse en determinadas patologías [88]. Sin embargo, los resultados mostraron que la proliferación de leucocitos inducida por PHA de los pacientes trasplantados fue inhibido por el SLPIrh (SLPI recombinante humano) de la misma con que lo hicieron los leucocitos derivados de individuos sanos. Sin embargo, la magnitud de esta inhibición fue menor para las células de los pacientes trasplantados. Teniendo en cuenta que el efecto inhibitorio del SLPIrh sobre los leucocitos depende de la presencia de los monocitos [90], y que no había diferencias significativas en los valores absolutos ni relativos en los monocitos de los pacientes trasplantados con respecto a los individuos sanos, resulta lógico explicar la ausencia de diferencias en la inhibición de la proliferación inducida por rhSLPI entre ambos grupos de individuos examinados.

Como fue mencionado, los pacientes trasplantados presentaron una mayor concentración sérica de SLPI. El correlato fisiopatológico de esta expresión endógena fue puesta en evidencia a través de una correlación entre los niveles séricos de SLPI con la capacidad proliferativa de leucocitos. Resulto muy interesante observar que aquellos pacientes que tenían niveles séricos de SLPI altos fueron aquellos mismos pacientes con menor índice de proliferación, sugiriendo que el SLPI endógeno podría estar ayudando a las drogas inmunosupresoras en su capacidad para lograr un mayor grado de inmunosupresión.

En conjunto, todos estos resultados ponen de relieve la función del SLPI en su capacidad inmunomoduladora en el área del trasplante de órganos sólidos, en particular trasplante renal. Por último, y considerando al SLPI como una molécula con actividad microbicida, postulamos que la administración de SLPI o las estrategias de inducción de SLPI en los

pacientes trasplantados podrían beneficiar al paciente, no sólo en su capacidad inmunosupresora sino también en su capacidad para reducir la incidencia aumentada de infecciones, que representan un grave problema en los pacientes inmunosuprimidos. La relevancia del SLPI, es aún mayor, si se tiene en cuenta que el SLPI tiene la capacidad de inhibir la nefrotoxicidad inducida por drogas inmunosupresoras (resultados obtenidos por otros miembros del grupo de trabajo). La conclusión final de esta tesis de maestría se resume en la Figura 17.

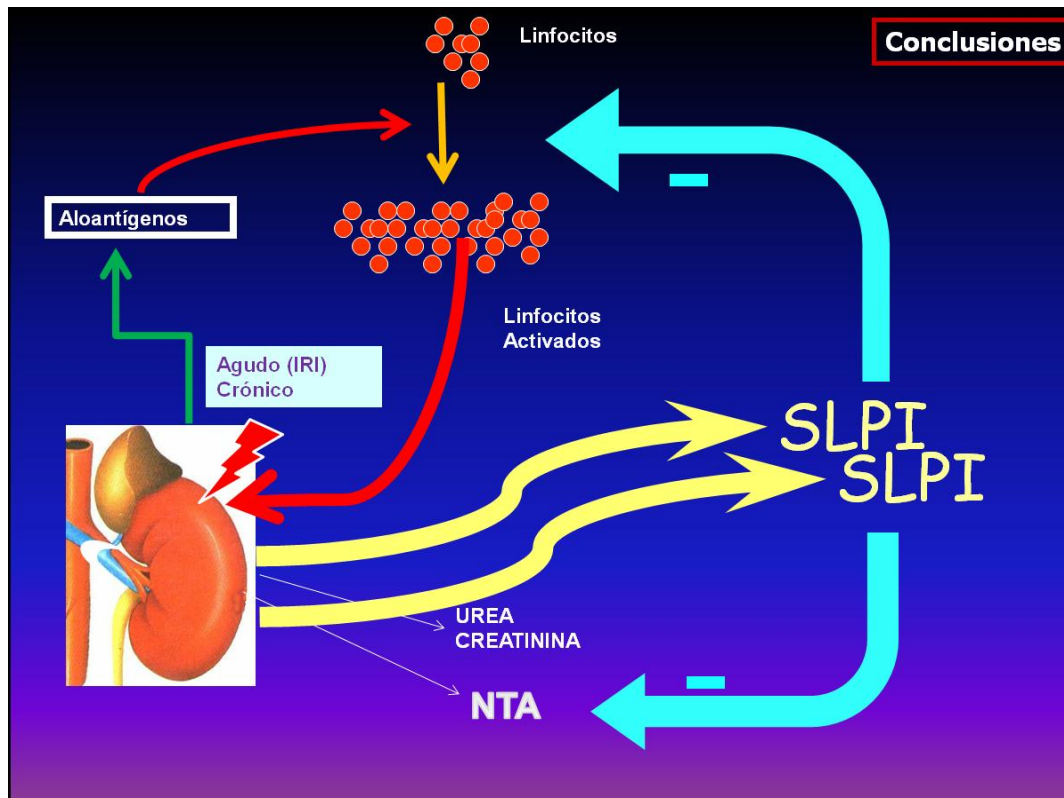


Fig.17- Conclusiones del efecto inmunomodulador de SLPI en pacientes con trasplante renal.

CONCLUSIONES

1. Los pacientes trasplantados tienen niveles altos de SLPI sérico comparados con los individuos sanos, pero menores a los del pre-trasplante.
2. Los niveles séricos de SLPI en los pacientes trasplantados tienden a disminuir con el tiempo post-trasplante.
3. Los niveles de SLPI se correlacionan con una menor función renal, probablemente indicando un nivel de injuria o daño renal.
4. La vía de mTOR modula la producción de SLPI, observándose una mayor expresión en los pacientes trasplantados e inmunosuprimidos con rapamicina.
5. Los pacientes trasplantados tienen una menor capacidad proliferativa de leucocitos que va incrementándose con el tiempo.
6. Los niveles séricos de SLPI se correlacionan de manera indirecta con la capacidad proliferativa de leucocitos.
7. El SLPI inhibe in vitro la proliferación leucocitaria tanto de individuos sanos como de pacientes trasplantados.

BIBLIOGRAPHY

1. Abbas A LA, Pillai S (2012) Cellular and molecular immunology: Saunders.
2. Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL, O'Connell PJ, Allen RD, et al. (2003) The natural history of chronic allograft nephropathy. *N Engl J Med* 349: 2326-2333.
3. Stegall MD, Park WD, Larson TS, Gloor JM, Cornell LD, et al. (2011) The histology of solitary renal allografts at 1 and 5 years after transplantation. *Am J Transplant* 11: 698-707.
4. El-Zoghby ZM, Stegall MD, Lager DJ, Kremers WK, Amer H, et al. (2009) Identifying specific causes of kidney allograft loss. *Am J Transplant* 9: 527-535.
5. Meier-Kriesche HU, Schold JD, Srinivas TR, Kaplan B (2004) Lack of improvement in renal allograft survival despite a marked decrease in acute rejection rates over the most recent era. *Am J Transplant* 4: 378-383.
6. Lamb KE, Lodhi S, Meier-Kriesche HU (2011) Long-term renal allograft survival in the United States: a critical reappraisal. *Am J Transplant* 11: 450-462.
7. Marsden PA (2003) Predicting outcomes after renal transplantation--new tools and old tools. *N Engl J Med* 349: 182-184.
8. Kaplan B, Meier-Kriesche HU (2002) Death after graft loss: an important late study endpoint in kidney transplantation. *Am J Transplant* 2: 970-974.
9. Knoll G, Muirhead N, Trpeski L, Zhu N, Badovinac K (2005) Patient survival following renal transplant failure in Canada. *Am J Transplant* 5: 1719-1724.
10. Nickerson P (2009) Post-transplant monitoring of renal allografts: are we there yet? *Curr Opin Immunol* 21: 563-568.
11. Karam S, Wali RK (2015) Current State of Immunosuppression: Past, Present, and Future. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 25: 113-134.
12. Ortega F (2007) Trasplante renal. Panamericana.
13. Solez K, Colvin RB, Racusen LC, Sis B, Halloran PF, et al. (2007) Banff '05 Meeting Report: differential diagnosis of chronic allograft injury and elimination of chronic allograft nephropathy ('CAN'). *Am J Transplant* 7: 518-526.
14. Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL, O'Connell PJ, Chapman JR, et al. (2004) Calcineurin inhibitor nephrotoxicity: longitudinal assessment by protocol histology. *Transplantation* 78: 557-565.
15. Stallone G, Infante B, Schena A, Battaglia M, Ditunno P, et al. (2005) Rapamycin for treatment of chronic allograft nephropathy in renal transplant patients. *J Am Soc Nephrol* 16: 3755-3762.
16. Abramowicz D, Del Carmen Rial M, Vitko S, del Castillo D, Manas D, et al. (2005) Cyclosporine withdrawal from a mycophenolate mofetil-containing immunosuppressive regimen: results of a five-year, prospective, randomized study. *J Am Soc Nephrol* 16: 2234-2240.
17. Mulay AV, Cockfield S, Stryker R, Fergusson D, Knoll GA (2006) Conversion from calcineurin inhibitors to sirolimus for chronic renal allograft dysfunction: a systematic review of the evidence. *Transplantation* 82: 1153-1162.
18. Bunnapradist S, Vincenti F (2009) Transplantation: To convert or not to convert: lessons from the CONVERT trial. *Nat Rev Nephrol* 5: 371-373.
19. Townamchai N, Safa K, Chandraker A (2013) Immunologic monitoring in kidney transplant recipients. *Kidney Res Clin Pract* 32: 52-61.
20. Wilflingseder J, Sunzenauer J, Toronyi E, Heinzel A, Kainz A, et al. (2014) Molecular pathogenesis of post-transplant acute kidney injury: assessment of whole-genome mRNA and miRNA profiles. *PLoS One* 9: e104164.
21. Thompson RC, Ohlsson K (1986) 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* 83: 6692-6696.
22. Seemuller U, Arnhold M, Fritz H, Wiedenmann K, Machleidt W, et al. (1986) The acid-stable proteinase inhibitor of human mucous secretions (HUSI-I, antileukoprotease). Complete amino acid sequence as revealed by protein and cDNA sequencing and structural homology to whey proteins and Red Sea turtle proteinase inhibitor. *FEBS Lett* 199: 43-48.
23. Williams SE, Brown TI, Roghanian A, Sallenave JM (2006) SLPI and elafin: one glove, many fingers. *Clin Sci (Lond)* 110: 21-35.
24. Sallenave JM (2010) Secretory leukocyte protease inhibitor and elafin/trappin-2: versatile mucosal antimicrobials and regulators of immunity. *Am J Respir Cell Mol Biol* 42: 635-643.

25. Kikuchi T, Abe T, Hoshi S, Matsubara N, Tominaga Y, et al. (1998) Structure of the murine secretory leukoprotease inhibitor (Slpi) gene and chromosomal localization of the human and murine SLPI genes. *Am J Respir Cell Mol Biol* 19: 875-880.
26. Stetler G, Brewer MT, Thompson RC (1986) Isolation and sequence of a human gene encoding a potent inhibitor of leukocyte proteases. *Nucleic Acids Res* 14: 7883-7896.
27. McGarry N, Greene CM, McElvaney NG, Weldon S, Taggart CC (2015) The Ability of Secretory Leukocyte Protease Inhibitor to Inhibit Apoptosis in Monocytes Is Independent of Its Antiprotease Activity. *J Immunol Res* 2015: 507315.
28. De Water R, Willems LN, Van Muijen GN, Franken C, Franssen JA, et al. (1986) Ultrastructural localization of bronchial antileukoprotease in central and peripheral human airways by a gold-labeling technique using monoclonal antibodies. *Am Rev Respir Dis* 133: 882-890.
29. Heinzl R, Appelhans H, Gassen G, Seemuller U, Machleidt W, et al. (1986) Molecular cloning and expression of cDNA for human antileukoprotease from cervix uterus. *Eur J Biochem* 160: 61-67.
30. Helmig R, Uldbjerg N, Ohlsson K (1995) Secretory leukocyte protease inhibitor in the cervical mucus and in the fetal membranes. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 59: 95-101.
31. Jin FY, Nathan C, Radzioch D, Ding A (1997) Secretory leukocyte protease inhibitor: a macrophage product induced by and antagonistic to bacterial lipopolysaccharide. *Cell* 88: 417-426.
32. King AE, Critchley HO, Kelly RW (2000) Presence of secretory leukocyte protease inhibitor in human endometrium and first trimester decidua suggests an antibacterial protective role. *Mol Hum Reprod* 6: 191-196.
33. Odaka C, Mizuochi T, Yang J, Ding A (2003) Murine macrophages produce secretory leukocyte protease inhibitor during clearance of apoptotic cells: implications for resolution of the inflammatory response. *J Immunol* 171: 1507-1514.
34. Samsom JN, van der Marel AP, van Berkel LA, van Helvoort JM, Simons-Oosterhuis Y, et al. (2007) Secretory leukoprotease inhibitor in mucosal lymph node dendritic cells regulates the threshold for mucosal tolerance. *J Immunol* 179: 6588-6595.
35. Schulze H, Korpai M, Bergmeier W, Italiano JE, Jr., Wahl SM, et al. (2004) Interactions between the megakaryocyte/platelet-specific beta1 tubulin and the secretory leukocyte protease inhibitor SLPI suggest a role for regulated proteolysis in platelet functions. *Blood* 104: 3949-3957.
36. Wang X, Li X, Xu L, Zhan Y, Yaish-Ohad S, et al. (2003) Up-regulation of secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) in the brain after ischemic stroke: adenoviral expression of SLPI protects brain from ischemic injury. *Mol Pharmacol* 64: 833-840.
37. Lilo E, Wald-Altman S, Solmesky LJ, Ben Yaakov K, Gershoni-Emek N, et al. (2013) Characterization of human sporadic ALS biomarkers in the familial ALS transgenic mSOD1(G93A) mouse model. *Hum Mol Genet* 22: 4720-4725.
38. Reardon C, Lechmann M, Brustle A, Gareau MG, Shuman N, et al. (2011) Thymic stromal lymphopoietin-induced expression of the endogenous inhibitory enzyme SLPI mediates recovery from colonic inflammation. *Immunity* 35: 223-235.
39. Sallenave JM, Shulmann J, Crossley J, Jordana M, Gaudie J (1994) 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* 11: 733-741.
40. Klimenkova O, Ellerbeck W, Klimiankou M, Unalan M, Kandabarau S, et al. (2014) A lack of secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) causes defects in granulocytic differentiation. *Blood* 123: 1239-1249.
41. Raundhal M, Morse C, Khare A, Oriss TB, Milosevic J, et al. (2015) High IFN-gamma and low SLPI mark severe asthma in mice and humans. *J Clin Invest* 125: 3037-3050.
42. Fakioglu E, Wilson SS, Mesquita PM, Hazrati E, Cheshenko N, et al. (2008) Herpes simplex virus downregulates secretory leukocyte protease inhibitor: a novel immune evasion mechanism. *J Virol* 82: 9337-9344.
43. Grobmyer SR, Barie PS, Nathan CF, Fuortes M, Lin E, et al. (2000) Secretory leukocyte protease inhibitor, an inhibitor of neutrophil activation, is elevated in serum in human sepsis and experimental endotoxemia. *Crit Care Med* 28: 1276-1282.
44. Taggart CC, Cryan SA, Weldon S, Gibbons A, Greene CM, et al. (2005) Secretory leukoprotease inhibitor binds to NF-kappaB binding sites in monocytes and inhibits p65 binding. *J Exp Med* 202: 1659-1668.
45. Zabieglo K, Majewski P, Majchrzak-Gorecka M, Wlodarczyk A, Grygier B, et al. (2015) The inhibitory effect of secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) on formation of neutrophil extracellular traps. *J Leukoc Biol* 98: 99-106.

46. Faller B, Mely Y, Gerard D, Bieth JG (1992) Heparin-induced conformational change and activation of mucus proteinase inhibitor. *Biochemistry* 31: 8285-8290.
47. Ma G, Greenwell-Wild T, Lei K, Jin W, Swisher J, et al. (2004) Secretory leukocyte protease inhibitor binds to annexin II, a cofactor for macrophage HIV-1 infection. *J Exp Med* 200: 1337-1346.
48. Tseng CC, Tseng CP (2000) Identification of a novel secretory leukocyte protease inhibitor-binding protein involved in membrane phospholipid movement. *FEBS Lett* 475: 232-236.
49. Xu W, He B, Chiu A, Chadburn A, Shan M, et al. (2007) Epithelial cells trigger frontline immunoglobulin class switching through a pathway regulated by the inhibitor SLPI. *Nat Immunol* 8: 294-303.
50. Boudier C, Bieth JG (1994) Oxidized mucus proteinase inhibitor: a fairly potent neutrophil elastase inhibitor. *Biochem J* 303 (Pt 1): 61-68.
51. Taggart CC, Lowe GJ, Greene CM, Mulgrew AT, O'Neill SJ, et al. (2001) Cathepsin B, L, and S cleave and inactivate secretory leucoprotease inhibitor. *J Biol Chem* 276: 33345-33352.
52. Weldon S, McNally P, McElvaney NG, Elborn JS, McAuley DF, et al. (2009) Decreased levels of secretory leucoprotease inhibitor in the Pseudomonas-infected cystic fibrosis lung are due to neutrophil elastase degradation. *J Immunol* 183: 8148-8156.
53. Belkowski SM, Boot JD, Mascelli MA, Diamant Z, de Garavilla L, et al. (2009) Cleaved secretory leukocyte protease inhibitor as a biomarker of chymase activity in allergic airway disease. *Clin Exp Allergy* 39: 1179-1186.
54. Johnson DA, Carter-Hamm B, Dralle WM (1982) Inactivation of human bronchial mucosal proteinase inhibitor by Pseudomonas aeruginosa elastase. *Am Rev Respir Dis* 126: 1070-1073.
55. Into T, Inomata M, Kanno Y, Matsuyama T, Machigashira M, et al. (2006) Arginine-specific gingipains from Porphyromonas gingivalis deprive protective functions of secretory leukocyte protease inhibitor in periodontal tissue. *Clin Exp Immunol* 145: 545-554.
56. Baranger K, Zani ML, Labas V, Dallet-Choisy S, Moreau T (2011) Secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) is, like its homologue trappin-2 (pre-elafin), a transglutaminase substrate. *PLoS One* 6: e20976.
57. Muto J, Kuroda K, Wachi H, Hirose S, Tajima S (2007) Accumulation of elafin in actinic elastosis of sun-damaged skin: elafin binds to elastin and prevents elastolytic degradation. *J Invest Dermatol* 127: 1358-1366.
58. Lee CH, Igarashi Y, Hohman RJ, Kaulbach H, White MV, et al. (1993) Distribution of secretory leukoprotease inhibitor in the human nasal airway. *Am Rev Respir Dis* 147: 710-716.
59. Tegner H (1978) Quantitation of human granulocyte protease inhibitors in non-purulent bronchial lavage fluids. *Acta Otolaryngol* 85: 282-289.
60. Zhu J, Nathan C, Jin W, Sim D, Ashcroft GS, et al. (2002) Conversion of proepithelin to epithelins: roles of SLPI and elastase in host defense and wound repair. *Cell* 111: 867-878.
61. Wright CD, Kennedy JA, Zitnik RJ, Kashem MA (1999) Inhibition of murine neutrophil serine proteinases by human and murine secretory leukocyte protease inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun* 254: 614-617.
62. Zitnik RJ, Zhang J, Kashem MA, Kohno T, Lyons DE, et al. (1997) The cloning and characterization of a murine secretory leukocyte protease inhibitor cDNA. *Biochem Biophys Res Commun* 232: 687-697.
63. Zhang Y, DeWitt DL, McNeely TB, Wahl SM, Wahl LM (1997) Secretory leukocyte protease inhibitor suppresses the production of monocyte prostaglandin H synthase-2, prostaglandin E2, and matrix metalloproteinases. *J Clin Invest* 99: 894-900.
64. Wen J, Nikitakis NG, Chaisuparat R, Greenwell-Wild T, Gliozzi M, et al. (2011) Secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) expression and tumor invasion in oral squamous cell carcinoma. *Am J Pathol* 178: 2866-2878.
65. Taggart CC, Greene CM, McElvaney NG, O'Neill S (2002) Secretory leucoprotease inhibitor prevents lipopolysaccharide-induced IkappaBalpha degradation without affecting phosphorylation or ubiquitination. *J Biol Chem* 277: 33648-33653.
66. Verma C, Seebah S, Low SM, Zhou L, Liu SP, et al. (2007) Defensins: antimicrobial peptides for therapeutic development. *Biotechnol J* 2: 1353-1359.
67. Hiemstra PS, Maassen RJ, Stolk J, Heinzl-Wieland R, Steffens GJ, et al. (1996) Antibacterial activity of antileukoprotease. *Infect Immun* 64: 4520-4524.
68. Tomee JF, Hiemstra PS, Heinzl-Wieland R, Kauffman HF (1997) Antileukoprotease: an endogenous protein in the innate mucosal defense against fungi. *J Infect Dis* 176: 740-747.
69. Scott A, Weldon S, Taggart CC (2011) SLPI and elafin: multifunctional antiproteases of the WFDC family. *Biochem Soc Trans* 39: 1437-1440.
70. Cooper MD, Roberts MH, Barauskas OL, Jarvis GA (2012) Secretory leukocyte protease inhibitor binds to Neisseria gonorrhoeae outer membrane opacity protein and is bactericidal. *Am J Reprod Immunol* 68: 116-127.

71. Miller KW, Evans RJ, Eisenberg SP, Thompson RC (1989) Secretory leukocyte protease inhibitor binding to mRNA and DNA as a possible cause of toxicity to *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 171: 2166-2172.
72. Fernie-King BA, Seilly DJ, Davies A, Lachmann PJ (2002) Streptococcal inhibitor of complement inhibits two additional components of the mucosal innate immune system: secretory leukocyte proteinase inhibitor and lysozyme. *Infect Immun* 70: 4908-4916.
73. Fernie-King BA, Seilly DJ, Lachmann PJ (2006) Inhibition of antimicrobial peptides by group A streptococci: SIC and DRS. *Biochem Soc Trans* 34: 273-275.
74. Yin L, Swanson B, An J, Hacker BM, Silverman GA, et al. (2010) Differential effects of periopathogens on host protease inhibitors SLPI, elafin, SCCA1, and SCCA2. *J Oral Microbiol* 2.
75. Gomez SA, Arguelles CL, Guerrieri D, Tateosian NL, Amiano NO, et al. (2009) Secretory leukocyte protease inhibitor: a secreted pattern recognition receptor for mycobacteria. *Am J Respir Crit Care Med* 179: 247-253.
76. McNeely TB, Shugars DC, Rosendahl M, Tucker C, Eisenberg SP, et al. (1997) Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 infectivity by secretory leukocyte protease inhibitor occurs prior to viral reverse transcription. *Blood* 90: 1141-1149.
77. Py B, Basmaciogullari S, Bouchet J, Zarka M, Moura IC, et al. (2009) The phospholipid scramblases 1 and 4 are cellular receptors for the secretory leukocyte protease inhibitor and interact with CD4 at the plasma membrane. *PLoS One* 4: e5006.
78. McNeely TB, Dealy M, Dripps DJ, Orenstein JM, Eisenberg SP, et al. (1995) Secretory leukocyte protease inhibitor: a human saliva protein exhibiting anti-human immunodeficiency virus 1 activity in vitro. *J Clin Invest* 96: 456-464.
79. Pillay K, Coutsoudis A, Agadzi-Naqvi AK, Kuhn L, Coovadia HM, et al. (2001) Secretory leukocyte protease inhibitor in vaginal fluids and perinatal human immunodeficiency virus type 1 transmission. *J Infect Dis* 183: 653-656.
80. Raff AB, Woodham AW, Raff LM, Skeate JG, Yan L, et al. (2013) The evolving field of human papillomavirus receptor research: a review of binding and entry. *J Virol* 87: 6062-6072.
81. Woodham AW, Da Silva DM, Skeate JG, Raff AB, Ambroso MR, et al. (2012) The S100A10 subunit of the annexin A2 heterotetramer facilitates L2-mediated human papillomavirus infection. *PLoS One* 7: e43519.
82. Ashcroft GS, Lei K, Jin W, Longenecker G, Kulkarni AB, et al. (2000) Secretory leukocyte protease inhibitor mediates non-redundant functions necessary for normal wound healing. *Nat Med* 6: 1147-1153.
83. Ashcroft GS, Jeong MJ, Ashworth JJ, Hardman M, Jin W, et al. (2012) Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) is a therapeutic target for impaired cutaneous wound healing. *Wound Repair Regen* 20: 38-49.
84. Mueller AM, Pedre X, Stempf T, Kleiter I, Couillard-Despres S, et al. (2008) Novel role for SLPI in MOG-induced EAE revealed by spinal cord expression analysis. *J Neuroinflammation* 5: 20.
85. Nakamura A, Mori Y, Hagiwara K, Suzuki T, Sakakibara T, et al. (2003) Increased susceptibility to LPS-induced endotoxin shock in secretory leukoprotease inhibitor (SLPI)-deficient mice. *J Exp Med* 197: 669-674.
86. Zhang D, Simmen RC, Michel FJ, Zhao G, Vale-Cruz D, et al. (2002) Secretory leukocyte protease inhibitor mediates proliferation of human endometrial epithelial cells by positive and negative regulation of growth-associated genes. *J Biol Chem* 277: 29999-30009.
87. Subramaniam D, Hollander C, Westin U, Erjefalt J, Stevens T, et al. (2011) Secretory leukocyte protease inhibitor inhibits neutrophil apoptosis. *Respirology* 16: 300-307.
88. Tateosian NL, Pasquinelli V, Hernandez Del Pino RE, Ambrosi N, Guerrieri D, et al. (2014) The impact of IFN-gamma receptor on SLPI expression in active tuberculosis: association with disease severity. *Am J Pathol* 184: 1268-1273.
89. Shugars DC, Watkins CA, Cowen HJ (2001) Salivary concentration of secretory leukocyte protease inhibitor, an antimicrobial protein, is decreased with advanced age. *Gerontology* 47: 246-253.
90. Guerrieri D, Tateosian NL, Maffia PC, Reiteri RM, Amiano NO, et al. (2011) Serine leucocyte proteinase inhibitor-treated monocyte inhibits human CD4(+) lymphocyte proliferation. *Immunology* 133: 434-441.
91. Rama I, Grinyo JM (2010) Malignancy after renal transplantation: the role of immunosuppression. *Nat Rev Nephrol* 6: 511-519.
92. Marcen R (2009) Immunosuppressive drugs in kidney transplantation: impact on patient survival, and incidence of cardiovascular disease, malignancy and infection. *Drugs* 69: 2227-2243.
93. Townamchai N, Eiam-Ong S (2015) Biomarkers in kidney transplantation: From bench to bedside. *World J Nephrol* 4: 487-491.
94. Ling X, Xiong J, Liang W, Schroder PM, Wu L, et al. (2012) Can immune cell function assay identify patients at risk of infection or rejection? A meta-analysis. *Transplantation* 93: 737-743.

95. Picard N, Bergan S, Marquet P, van Gelder T, Wallemacq P, et al. (2016) Pharmacogenetic Biomarkers Predictive of the Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Immunosuppressive Drugs. *Ther Drug Monit* 38 Suppl 1: S57-69.
96. Shipkova M, Lopez OM, Picard N, Noceti O, Sommerer C, et al. (2016) Analytical Aspects of the Implementation of Biomarkers in Clinical Transplantation. *Ther Drug Monit* 38 Suppl 1: S80-92.
97. Guazzone VA, Guerrieri D, Jacobo P, Glisoni RJ, Chiappetta D, et al. (2011) Micro-encapsulated secretory leukocyte protease inhibitor decreases cell-mediated immune response in autoimmune orchitis. *Life Sci* 89: 100-106.
98. Song X, Zeng L, Jin W, Thompson J, Mizel DE, et al. (1999) Secretory leukocyte protease inhibitor suppresses the inflammation and joint damage of bacterial cell wall-induced arthritis. *J Exp Med* 190: 535-542.
99. Ramirez R, Carracedo J, Merino A, Nogueras S, Alvarez-Lara MA, et al. (2007) Microinflammation induces endothelial damage in hemodialysis patients: the role of convective transport. *Kidney Int* 72: 108-113.
100. Malyszko JS, Malyszko J, Hryszko T, Kozminski P, Pawlak K, et al. (2006) Markers of endothelial damage in patients on hemodialysis and hemodiafiltration. *J Nephrol* 19: 150-154.
101. Tsoumakidou M, Bouloukaki I, Thimaki K, Tzanakis N, Siafakas NM (2010) Innate immunity proteins in chronic obstructive pulmonary disease and idiopathic pulmonary fibrosis. *Exp Lung Res* 36: 373-380.
102. Hernandez D, Martinez D, Gutierrez E, Lopez V, Gutierrez C, et al. (2011) Clinical evidence on the use of anti-mTOR drugs in renal transplantation. *Nefrologia* 31: 27-34.