

Tesi doctoral presentada per En/Na

Marta PUIGMULÉ RAURICH

amb el títol

**"Caracterització dels sistemes renals de ratolí i humà
(PCT3 I HK-2). Mecanismes moleculars implicats en la
nefrotoxicitat produïda per la CsA en el túbul proximal
renal"**

per a l'obtenció del títol de Doctor/a en

BIOLOGIA

Barcelona, 29 de maig de 2008

Facultat de Biologia
Departament de Bioquímica i Biologia Molecular



UNIVERSITAT DE BARCELONA

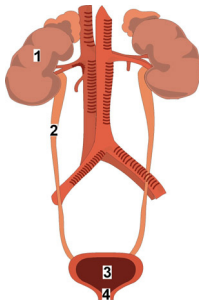


INTRODUCCIÓ

1. L'APARELL RENAL

1.1. EL SISTEMA EXCRETOR

La funció principal de l'aparell renal o urinari és la d'eliminar de la circulació tots els productes catabòlics finals i altres substàncies de desfet, provinents majoritàriament del metabolisme cel·lular, per a ser evacuades fora del cos de l'animal. El sistema excretor de mamífers està format principalment pel ronyó i els seus conductes associats.



L'aparell urinari està format pels ronyons, productors i secretors de l'orina, els urèters que són els conductes encarregats de transportar l'orina fins a la bufeta urinària on serà retinguda durant un temps i per últim la uretra que la transportarà fins a l'exterior de l'organisme (FIGURA 1).

Figura 1. El sistema urinari. Esquema del sistema urinari on es mostren els diferents òrgans que el constitueixen: (1) els ronyons, (2) els urèters, (3) la bufeta urinària i (4) la uretra. Imatge obtinguda a la pàgina web www.genesis.uag.mx.

1.2. EL RONYÓ

És l'òrgan fonamental de l'aparell urinari propi dels vertebrats. Importa i exporta grans volums d'aigua i soluts en resposta a diferents situacions fisiològiques.

El ronyó porta a terme les seves accions homeostàtiques a través d'una filtració glomerular selectiva, mitjançada per l'elevada pressió selectiva en el glomèrul, secreció tubular de toxines i reabsorció de substàncies metabòliques importants (sucres, aminoàcids, etcètera). Tots aquests processos són els que regulen la concentració dels productes finals del metabolisme, la pressió osmòtica, l'equilibri àcid-base, la composició iònica i el volum mitjà intern.

El ronyó també intervé en dos mecanismes homeostàtics mitjançats per hormones de vital importància:

- i) La síntesi i excreció d'eritropoetina implicada en la producció d'eritròcits per la medulla òssia.
- ii) La participació en el manteniment i regulació de la pressió sanguínia pel sistema renina-angiotensina. Principalment a través de la secreció de renina.

1.2.1. Origen embrionari del ronyó

El desenvolupament embrionari del ronyó es succeeix en tres òrgans excretors diferents: el pronefre, el metanefre i el mesonefre originats a partir d'una massa cel·lular intermèdia mesodèrmica.

En mamífers, el pronefre i el metanefre només són presents durant les primeres etapes del desenvolupament embrionari, de manera que el ronyó definitiu es forma a partir del mesonefre. En amfibis i peixos, en canvi, el pronefre és completament funcional i indispensable durant la vida larvària, en la vida adulta el pronefre pateix un procés de regressió i apoptosi, essent substituït pel mesonefre que esdevindrà el ronyó definitiu.

En el ratolí, el desenvolupament del metanefre s'inicia als voltants del dia 11 de gestació. El procés més important és la estimulació mútua entre les cèl·lules mesenquimals, metanèfriques i les cèl·lules epitelials del bulb urètic. A partir d'aquest moment les cèl·lules mesenquimals indiferenciades es condensen patint una transformació i diferenciant-se per donar lloc al corpuscle renal rudimentari. Paral·lelament el bulb urètic s'expandeix i creix ramificant-se pel còrtex en expansió. El desenvolupament morfològic d'aquesta nefrona immadura es confirma cap el dia 17 gestacional, completant-se durant el període perinatal (FIGURA 2).

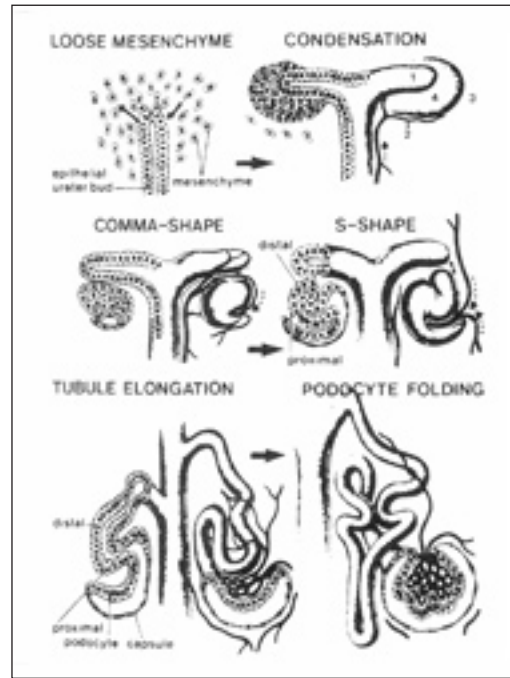


Figura 2. Esquema del desenvolupament de la nefrona. L'estimulació mútua entre el mesènquima metanèfric i el bulb urètic, donaran lloc a una sèrie de passos molt ben definits que conduiran a la formació de la nefrona. (Extret i modificat de "The Kidney" (Brenner B.M. ed.), 5th ed., W.B. Saunders, Philadelphia, vol. I, pp. 73).

1.2.2. Anatomia general

Els ronyons són dos òrgans parells de la forma d'una mongeta i de la mida d'un puny, que estan situats a la part posterior de l'abdomen, sota la caixa toràcica, un a cada banda de la columna vertebral. Cada un d'ells està envoltat per una túnica fibrosa formant una làmina ferma que embolcalla tot

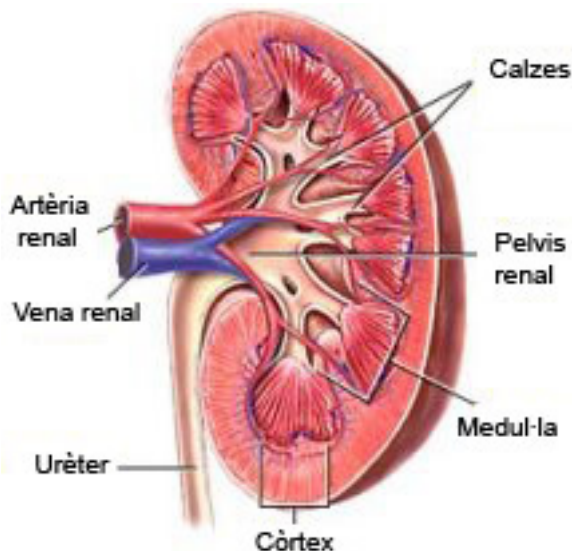


Figura 3. Secció vertical del ronyó. Esquema de l'estructura del ronyó on s'identifiquen les dues zones en les quals es distribueix la substància renal: l'escorça o còrtex i la medul·la. Imatge obtinguda a la pàgina de web www.anatomia.tripod.com/rinon.htm.

l'òrgan. En humans, i en la majoria de mamífers, de cada ronyó en surt una artèria renal que prové directament de l'aorta abdominal de manera que rep la sang arterial a la màxima pressió possible. La sang un cop filtrada al glomèrul, surt del ronyó per la vena renal. El sistema vascular està íntimament connectat amb les unitats funcionals del ronyó, les nefrones.

Si analitzem el ronyó a partir d'una secció longitudinal s'identifiquen dues zones: una part més externa anomenada escorça renal o còrtex i una part més interna anomenada medul·la (FIGURA 3). Així mateix la medul·la també es pot dividir amb una part interna i una part externa. Ja que està formada per les piràmides renals. Cada piràmide es divideix en una zona externa, pròxima al còr-

tex i una zona més interna que desemboca al sinus renal. En mamífers petits com els rosegadors, el ronyó conté una única piràmide renal (unipapil·lar). En mamífers més grans com l'home, el ronyó contenen múltiples papil·les.

1.2.3. La nefrona (o nefró)

És la unitat funcional del ronyó. És la responsable de la filtració i de la purificació de la sang. Un ronyó humà conté al voltant d'un milió de nefrones, mentre que el ronyó de rata adulta en conté unes 30.000.

La nefrona està formada pel corpuscle renal, els túbuls distals, la nansa de Henle, el túbul col·lector i l'aparell juxtaglomerular. Funcionalment podem dividir la nefrona en segments, on cada un d'ells desenvolupa diferents funcions específiques que depenen dels gens expressats en cada segment (FIGURA 4).

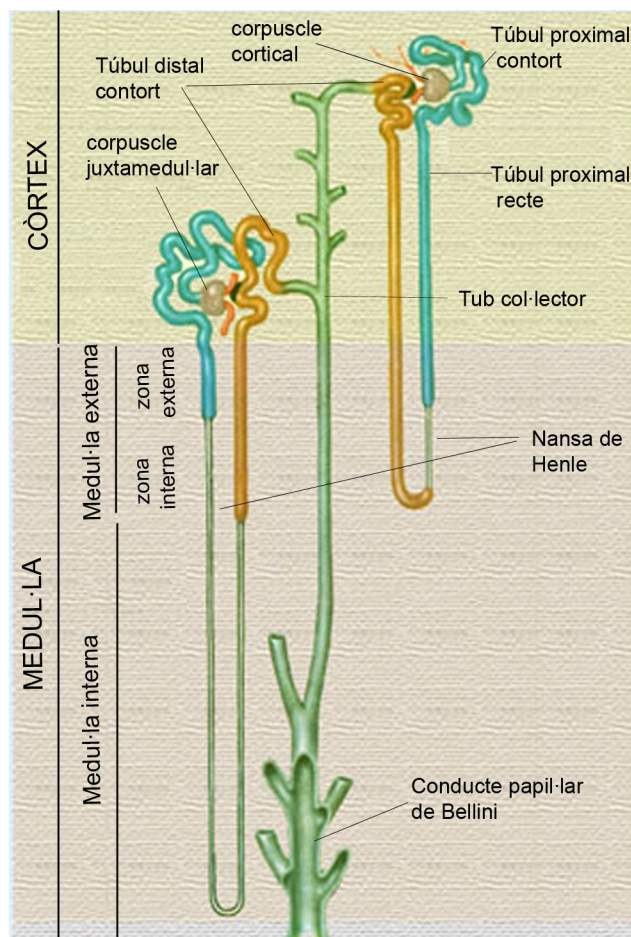


Figura 4. La nefrona. Esquema de les estructures principals d'una nefrona cortical (esquerra) i d'una nefrona juxtamedul·lar (dreta). També s'indica la localització en el ronyó dels diferents segments de la nefrona. Imatge obtinguda a la pàgina web www.iqb.es/cbasicas/anatomia.

S'identifiquen dues poblacions de nefrones:

i) **les nefrones corticals:** els glomèruls estan situats a la part externa del còrtex i tenen nanses de Henle reduïdes que es mantenen en el mateix còrtex o penetren únicament a la zona externa de la medul·la.

ii) **les nefrones juxtamedul·lars:** els glomèruls estan situats al còrtex intern i presenten nanses de Henle més llargues que penetren profundament a la zona interna de la medul·la.

Segons la posició dels diferents segments de la nefrona, la medul·la es divideix en tres regions diferenciades:

i) **la medul·la interna:** que conté part del segment prim ascendent i descendent de la nansa de Henle i part del túbul col·lector.

ii) **la zona interna de la medul·la externa:** que conté la resta de fragments prim descendent i el gruixut ascendent de la nansa de Henle i part del túbul col·lector.

iii) **la zona externa de la medul·la externa:**

que conté el túbul proximal recte, el túbul distal recte i el túbul col·lector.

A la regió cortical s'hi localitzen els corpuscles renals, el segment contornejat dels túbuls proximals i distals, part del segment recte d'aquests túbuls i part dels túbuls col·lectors (FIGURA 4).

1.2.3.1. El corpuscle renal

Els túbuls renals s'inicien als corpuscles renals. Aquests, estan constituïts per dues parts: el **glomèrul** i per una coberta membranosa anomenada **càpsula glomerular o de Bowman** que és el començament del túbul proximal.

El glomèrul és un cabdell de capil·lars sanguinis entortolligats units per teixit connectiu. La sang entra al glomèrul per l'arteriola aferent, travessa la xarxa de capil·lars i surt per l'arteriola eferent de diàmetre menor. Aquestes dues arterioles entren i surten del glomèrul pel mateix punt: el pol vascular. Dins la càpsula, el glomèrul està revestit per una capa de cèl·lules epitelials anomenades podocits, que formen la capa visceral de la càpsula de *Bowman*. Entre aquesta capa i la capa epitelial parietal de la càpsula de *Bowman* pròpiament dita s'hi troba l'espai de *Bowman* que té continuïtat amb la llum del túbul proximal (FIGURA 5). Els elements plasmàtics es filtren pels capil·lars glomerulars cap a l'espai de *Bowman* i el filtrat glomerular és conduït pel túbul renal. La barrera de filtració entre la llum del capil·lar i l'espai de *Bowman* està format per l'endoteli capil·lar, la membrana basal d'aquest i la capa de podocits.

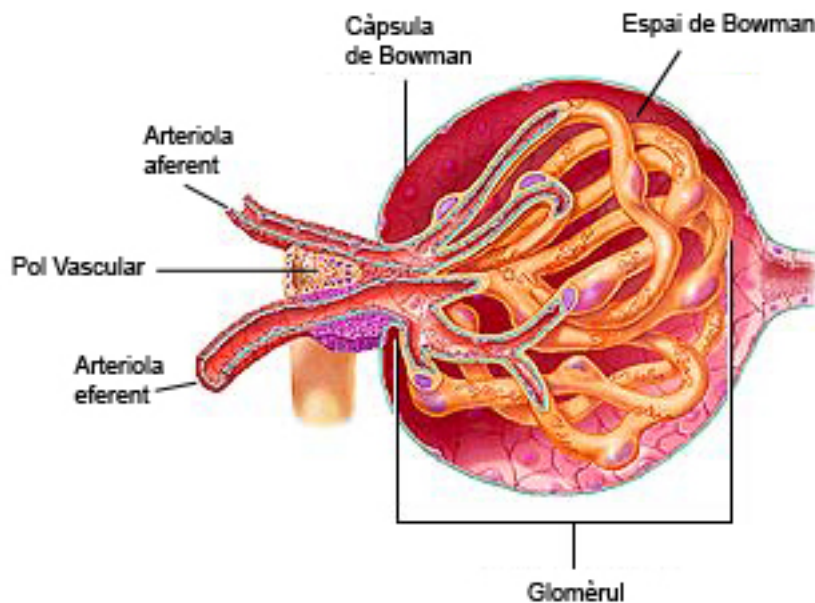


Figura 5. El corpuscle renal. Esquema de les estructures que formen part del corpuscle renal. Imatge obtinguda a la pàgina web www.besthealth.com/images/nephron.jpg.

1.2.3.2. El túbul proximal

Pel seu interior hi circula el filtrat glomerular que al final del seu recorregut s'haurà convertit en orina. Topològicament es distingeix en dos components: la *pars convoluta* o contornejada de forma entortolligada i que és la continuació de l'epiteli parietal de la càpsula de *Bowman* i la *pars recta* més o menys rectilínia que s'endinsa cap a les zones més internes de la medul·la renal.

En rata, ratolí, conill i en alguns simis, però no en humans, es distingeixen en el túbul proximal tres segments morfològicament diferents: l'S1, l'S2 i l'S3 (FIGURA 6). El segment S1, és la part inicial

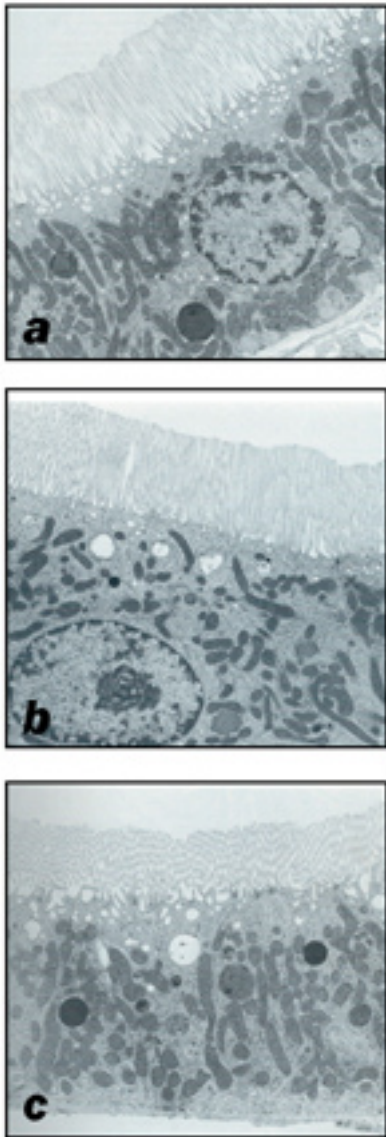


Figura 6. Segments del túbul proximal renal. Micrografies electròniques de transmissió dels segments S1 (a), S2 (b) i S3 (c) del túbul proximal renal de rata (10.600X). (Extret i modificat de "The Kidney" (Brenner B.M. ed.), 5th ed., W.B. Saunders, Philadelphia, vol. I, pp. 73).

del túbul proximal, que comença en el glomèrul i transcorre 2/3 parts de la *pars convoluta*. El segment S2 està format per l'últim terç de la *pars convoluta* i la part inicial de la *pars recta*. Per últim, el segment S3 està format pel que queda de *pars recta*, localitzat en el còrtex profund i la part externa de la medul·la externa. Cada un d'aquests segments està format per diferents tipus cel·lulars epitelials coneguts també com S1, S2 i S3. Tal i com s'ha esmentat anteriorment, en el ronyó humà, només es distingeixen positivament la *pars contornejada* i la *recta*.

El prototipus de cèl·lula tubular epitelial és de forma columnar amb una membrana apical *brush border* o membrana de raspall molt desenvolupada, una membrana basal que li serveix d'adhesiu i de suport i un citoesquelet organitzat i molt especialitzat per interaccionar amb la membrana plasmàtica i proteïnes d'adhesió. La polarització i la distribució apical-basolateral d'aquestes cèl·lules són essencials pel correcte funcionament del túbul.

El segment S1 està constituït per unes cèl·lules amb una àmplia membrana apical amb rivet de raspall o *brush border* que augmenta la superfície de contacte amb la llum del túbul incrementant la seva capacitat per reabsorbir petits compostos orgànics presents en el filtrat glomerular. Els microvilli que formen el *brush border* estan coberts per un glicocàlix i conté gran varietat d'enzims implicats en la degradació de pèptids i altres substàncies que poden ser transportats a l'interior de la cèl·lula. Aquestes cèl·lules també consten d'un sistema vacuolar-lisosomal ben desenvolupat que permet l'endocitosi i degradació de macromolècules de l'ultrafiltrat com l'albumina o proteïnes plasmàtiques de baix pes molecular. El nucli és gran i es troba al centre de la cèl·lula. La superfície basolateral d'aquestes cèl·lules també està

amplificada gràcies a la formació de prolongacions que s'interdigiten amb les prolongacions de cèl·lules adjacents deixant un espai intercel·lular. Les cèl·lules S1 contenen un gran nombre de mitocòndries (FIGURA 6A). Les cèl·lules que formen part del segment S2, tenen microvellositats més curtes i menys denses que les cèl·lules del segment S1, així com menor complexitat en les prolongacions laterals. Tenen un menor nombre de mitocòndries i són d'una mida més petita (FIGURA 6B). En les cèl·lules del segment S3, els processos laterals són absents, presenten un nombre de mitocòndries inferior i estan repartides aleatòriament per la cèl·lula. A les cèl·lules S3, l'òrganul més important i abundant és el peroxisoma, important en el metabolisme lipídic i la β -oxidació dels àcids grassos (FIGURA 6C).

El pas del segment S1 a S2 és progressiu mentre que el de S2 a S3 és abrupte en diferents espècies entre les que s'hi troba la rata i el ratolí. Al llarg del túbul la maquinària del transport i de l'aparell endocític i lisosomal disminueix conseqüència dels canvis que pateix el filtrat.

1.2.3.3. La Nansa de Henle

És un segment del túbul renal en forma de nansa, situat entre el túbul proximal i el túbul distal que penetra cap a la medul·la renal. Està formada per una primera branca descendent, una branca prima ascendent i una branca gruixuda ascendent. Reabsorbeix al voltant d'un 25% dels ions sodi i clor filtrats i un 15% d'aigua. La sortida preferent de sodi en relació amb l'aigua determina una hipertonia de l'interstici renal, indispensable per a concentrar o diluir l'orina i per tant mantenir el balanç hídric de l'organisme.

1.2.3.4. Els túbuls distals o col·lectors

El túbul distal està format per tres segments morfològicament diferenciats. La branca gruixuda ascendent de la nansa de Henle, la màcula densa (localitzada a l'aparell juxtaglomerular) i el túbul contort distal.

La màcula densa es localitza a l'epiteli del túbul renal quan entra en contacte amb el pol vascular del glomèrul. Anàtomica i funcionalment està associada a les cèl·lules juxtaglomerulars de l'arteriola aferent i la seva funció és la d'actuar com a quimiorceptor.

El túbul contort distal és la part contornejada del túbul distal situat íntegrament al còrtex renal, que drena el seu contingut al túbul col·lector. Reabsorbeix la major part dels ions sodi i clor filtrats que no han estat reabsorbits en el túbul proximal o en la nansa de Henle. La reabsorció de sodi és activa gràcies a la bomba de $\text{Na}^+ \text{K}^+$ ATPasa, mentre que la reabsorció de clor és passiva. És poc permeable a l'aigua i poc sensible a l'hormona antidiurètica, exceptuant a la seva regió més terminal. Secreta H^+ per mitjà d'una bomba de protons potenciada per l'aldosterona i també secreta ions potassi de forma passiva. Els túbuls distals es diferencien dels túbuls corticals per absència de rivet de raspall, una llum més àmplia i més definida, una quantitat major de nuclis en el tall transversal degut a que les cèl·lules són més petites i una baixa afinitat pels colorants citoplasmàtics degut a una menor quantitat d'òrgànuls. A nivell d'ultraestructura presenten un alt nombre de mitocòndries i invaginacions de la membrana plasmàtica basal. A la superfície luminal presenten pocs microvil·lis.

El tub col·lector és l'estructura tubular del ronyó que recull l'orina dels túbuls contornejats distals de diferents nefrons, que conflueix amb altres tubs col·lectors i desemboca finalment al conducte papil·lar de Bellini. Està format per dos segments, un de medul·lar i un de cortical. És el responsable del manteniment del balanç hídric sota el control de l'hormona antidiurètica. Està revestit per un epiteli cuboide que progressivament es fa més baix, no presenta rivet de raspall i té un citoplasma clar (FIGURA 7).

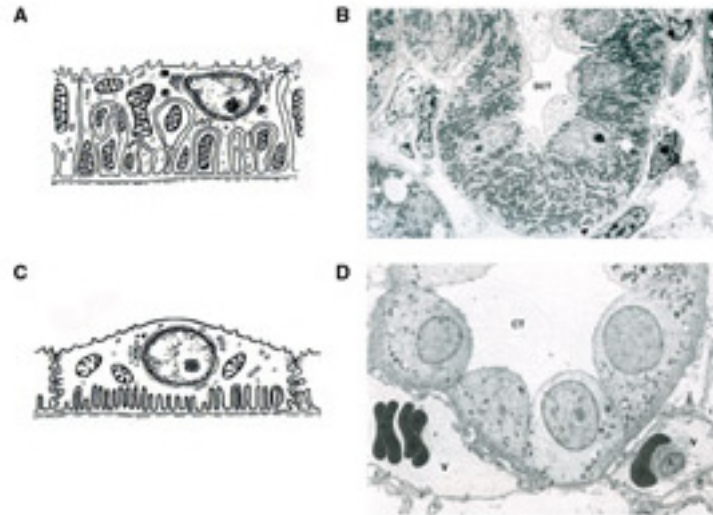


Figura 7. Túbuls distals i col·lectors. Representació d'una cèl·lula pertanyent a un túbul contort distal (A) i a un túbul col·lector (C) on s'aprecien les seves principals característiques. Es mostra també, per microscopia electrònica el detall d'una cèl·lula del túbul distal contort (DCT) (3.000X) (B) i d'una cèl·lula del túbul col·lector (CT) (4.000X) (D). (Extret i modificat Wheeler P.R. et al., 1987).

1.2.3.5. L'aparell juxtaglomerular

Es localitza a la regió vascular del glomèrul, on una porció del túbul distal de la nefrona entra en contacte amb el seu glomèrul parental. L'aparell juxtaglomerular s'encarrega principalment de la regulació de la pressió arterial a través del control del sistema renina-angiotensina (RAS), mitjançant la secreció de renina.

1.2.4. Aspectes funcionals

La funció principal del ronyó és l'excreció diferencial de diverses substàncies per tal de mantenir constants la composició química del plasma sanguini i dels líquids extracel·lulars. Els túbuls renals processen grans volums de filtrat per tal d'aconseguir:

- i) La funció endocrina: síntesi de metabòlits actius de la vitamina D, síntesi d'eritropoetina, quinines i prostaglandines i els sistema renina-angiotensina.
- ii) L'eliminació de substàncies potencialment tòxiques per l'organisme (urea, nitrogen, creatinina, etcètera).
- iii) La regulació del medi intern. Equilibri hidroelèctric i àcid-base.

Aquestes funcions es duen a terme en diferents parts del ronyó. Les funcions reguladora i excretora s'aconsegueixen formant i eliminant una orina de composició adequada en funció de les necessitats de l'organisme. Després de formar-se l'ultrafiltrat del plasma al glomèrul, el túbul s'encarrega al llarg dels seus diferents segments de modificar la composició de l'ultrafiltrat fins a formar una orina de composició definida que serà eliminada.

El processament i la reabsorció del 80% del filtrat glomerular es dona a la primera part del túbul proximal aconseguint així: 1) conservar els nutrients essencials com la glucosa, aminoàcids, vitamini-

nes, ions, entre d'altres, 2) eliminar compostos de rebuig i substàncies potencialment tòxiques per l'organisme com creatinina, urea, etcètera i 3) reduir al màxim la quantitat d'aigua i sals (Na^+ i Cl^-) excretades normalment fins a menys d'un 1% del filtrat. A la part restant del túbul proximal es dona la secreció d'anions i de cations orgànics, aigua i ions hidrogen per tal de mantenir l'homeòstasi. El bicarbonat filtrat (HCO_3^-), en canvi, es reabsorbeix al llarg de tot el túbul. El líquid que surt del túbul proximal, és una solució de NaCl amb petites quantitats de K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , urea, bicarbonat i substàncies orgàniques secretades, havent reduït aproximadament la meitat del volum filtrat inicialment i mantenint la mateixa osmolaritat. En les parts més distals de la nefrona, es dona de manera predominant la reabsorció de NaCl , l'excreció de l'excés d'aigua o la seva concentració, la reabsorció de calci i magnesi i la secreció de potassi i ions H^+ .

La reabsorció d'aigua i de soluts per part del ronyó, així com l'excreció de productes de desfet o tòxics per a les cèl·lules són processos que requereixen energia. Per processar les elevades quantitats d'ultrafiltrat (180 l diaris en humans) el ronyó ha de mantenir una elevada producció i utilització d'energia. Existeix doncs, una elevada relació entre el transport renal i el metabolisme, de manera que aquest últim està acoblat a la producció d'energia pels processos metabòlics cel·lulars.

El transport actiu de ions està mediat per una família d'ATPases integrals de membrana que hidrolitzen l'ATP com a font d'energia per a transportar K^+ , Na^+ , H^+ i Ca^{2+} . D'entre totes elles l'ATPasa de Na^+/K^+ , o bomba de sodi-potassi, és la que consumeix més energia (60% - 80%). El ronyó obté tota l'energia necessària principalment de la fosforilació oxidativa mitocondrial utilitzant com a substrats àcids grassos lliures, cossos cetònics, lactat o glutamina; per tant el ronyó presenta un metabolisme oxidatiu aeròbic. El ronyó essencialment és un òrgan més gluconeogènic que glucolític, presentant una elevada taxa gluconeogènica, no obstant, només exporta una petita fracció de la glucosa sintetitzada conseqüència de que les cèl·lules del túbul distal consumeixen pràcticament tota la glucosa sintetitzada en els túbuls proximals.

2. LA CICLOSPORINA A

2.1. ASPECTES GENERALS

La ciclosporina A (CsA) és un pèptid neutre, lipofílic i cíclic format per 11 aminoàcids aïllat per primera vegada al 1976 del fong *Tolypocladium inflatum gams*. Aquesta molècula presenta un ampli espectre de propietats biològiques que inclouen efectes antiparàsits, fungicides i antiinflamatoris. Posteriorment es va descobrir com un potent agent immunosupressor (Borel J.F. et al., 1976).

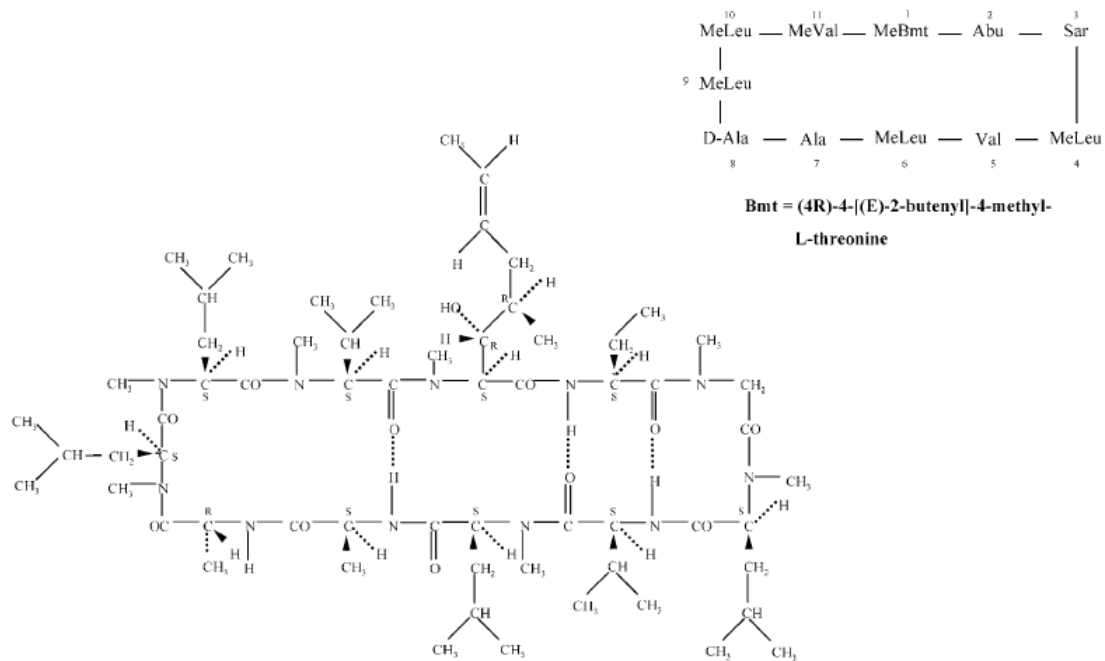


Figura 8. La ciclosporina A. A la part superior es mostren els 11 aminoàcids que constitueixen el fàrmac. A la part inferior, detall de l'estructura química de la CsA.

La CsA és un undecà-pèptid ($C_{64}H_{111}N_{11}O_{12}$) amb un pes molecular de 1203.63 Da. La seva estructura química és peculiar ja que conté dos aminoàcids poc comuns. A la posició 1 s'hi troba l'àcid 3-hydroxy-4-metil-2-metilamino-6-octanoicconté (MeBmt) i a la posició 2 l'àcid L-2-aminobutíric. A més, la molècula de CsA presenta un 64% dels enllaços peptídics metilats (Altschuh D. et al., 2002) (FIGURA 8). Aquest fàrmac es metabolitza al fetge per la superfamília de citocrom oxidasa P-450.

La CsA produeix la inhibició de l'activació del limfòcits T (Shreiber S.L. et al., 1991). Des del moment de la seva aprovació per a l'ús clínic l'any 1983, la CsA ha suposat una revolució en el trasplantament d'òrgans degut a l'ús generalitzat per a la prevenció del rebuig agut dels òrgans trasplantats. Així també ha estat àmpliament utilitzat en el tractament de malalties autoimmunes com són el lupus (Dostal C. et al., 1998), la psoriasi (Feutren G. et al., 1990), l'artritis reumàtica (Reiff A. et al., 1997) entre altres.

Malgrat els grans resultats obtinguts a la clínica, l'ús de la CsA s'ha vist limitat per la toxicitat renal que presenta (Mihatsch M.J. et al., 1989, de Mattos A.M. et al., 2000).

2.2. ACTIVACIÓ I PROLIFERACIÓ DE LA CÈL·LULA T

L'activació dels limfòcits T i B es dona per la unió de l'antigen al receptor dels limfòcits i per la presència de senyals coestimuladors que provenen d'altres receptors situats a la membrana dels mateixos limfòcits (generalment CD28). Com a conseqüència s'activen un elevat nombre de vies de senyalització cel·lulars que permeten l'activació transcripcional de determinats gens, la proliferació de limfòcits i l'alliberació de citoquines (Stoddard B.L. et al., 1996).

Quan el receptor de la cèl·lula T (TCR) reconeix l'antigen es produeix un agrupament de TCRs, induint la fosforilació de la tirosina de les proteïnes associades als dominis citoplasmàtics CD3 del receptor i de les proteïnes adaptadores reclutant i activant diverses molècules de senyalització. Una d'aquestes vies activa la fosfolipasa C (PLC γ). Aquesta, catalitza la hidròlisi del fosfolípid de membrana fosfoinositol bifosfat (PIP2) generant els missatgers secundaris inositol 1,4,5-trifosfat (IP3) i diacilglicerol (DAG). Mentre el DAG, activa la proteïnasa C (PKC), l'IP3 difon ràpidament a través del citosol fins arribar al reticle endoplasmàtic estimulant l'alliberació de calci, produint un augment de la concentració del calci lliure al citosol. A més, per mecanismes que encara es desconeixen es produeix una entrada de calci extracel·lular produïda per senyals generats pel TCR. Aquest augment promou l'activació de la calmodulina. El complex calci-calmodulina activa la Ser/Thr-fosfatasa dependent de calci i calmodulina, la calcineurina.

La calcineurina és un heterodímer format per una subunitat catalítica de 57- 59 KDa (calcineurina A, CnA) i una subunitat reguladora de 29 KDa (calcineurina B, CnB). La calmodulina activada interacciona amb la subunitat catalítica de la calcineurina fet que allibera el domini autoinhibitori del centre actiu activant així l'activitat fosfatasa de la calcineurina (Rusnak F. et al., 2000). Al limfòcit T, la calcineurina activada defosforila el factor de transcripció NFAT (*Nuclear Factor of Activated T cell*). Les proteïnes NFAT, de cèl·lules en repòs, resideixen al citoplasma i mostren baixa afinitat pel DNA. La calcineurina activada interacciona amb el domini N-terminal conservat entre els diferents membres de la família dels NFAT i en promou la defosforilació. Aquesta defosforilació descobreix el senyal de localització nuclear que permet la translocació de l'NFAT al nucli. Un cop dins al nucli, l'NFAT activa la transcripció del gen IL-2 necessari per a l'activació de les cèl·lules T. La calcineurina també es trasloca al nucli per tal de mantenir l'NFAT en el seu estat actiu i evitar el seu export del nucli. ("Inmunología Celular y Molecular" Abbas A.K. 4ta edició; Rezzani R. et al., 2004).

L'activació transcripcional del gen IL-2, requereix la interacció cooperativa de diferents factors a més de l'NFAT, com són AP-1, NF- κ B i l'Oct-1 (Jain J. et al., 1995). L'activació de la PKC pel DAG promou l'acumulació de proteïnes Ras unides a GTP i activades que interaccionen directament amb la Ser/Thr-quinasa Raf-1. Aquesta quinasa regula l'activitat de la cascada de les MAPquinases. L'activació final de les quinases porta a la fosforilació de c-jun que heterodimeritza amb c-fos per formar el complex AP-1 (Matsuda S. et al., 1998; Clements J.L. et al., 1999).

La interacció de NFAT i AP-1 en el promotor de la IL-2 permet la expressió de la citoquina. Aquesta expressió depèn de la integració dels senyals dependents de calci i de la via dependent de PKC iniciades amb l'activació del limfòcit.

La coestimulació CD28 genera senyals de transducció de senyal diferents que també contribueixen

a l'activació del limfòcit T. L'activació de CD28 per unió al lligand activa la fosfatidilinositol-3-quinasa (PI-3-quinasa) i permet la formació dels inositols trifosfats (IP3) essencials per a de les JNK quinasas formant-se en últim terme el complex AP-1 (Pages F. et al., 1994; Parry R.V. et al., 1997; Eder A.M. et al., 1998). La PI-3-quinasa també és la responsable indirectament de la inhibició de la glicogen sintetasa quinasa (GSK-3), impedit la fosforilació de NFAT i facilitant la seva translocació al nucli (Masuda E.S. et al., 1998) (FIGURA 9).

2.3. MECANISME D'IMMUNOSUPRESSIÓ DE LA CsA

El mecanisme pel qual la CsA produeix el seu efecte immunosupressor sobre el limfòcit T és ben conegut. Nombrosos estudis revelen que la CsA s'uneix a la proteïna intracel·lular ciclofilina. La formació del complex ciclofilina-CsA s'uneix i inhibeix l'activitat de la calcineurina, impedit la defosforilació del factor NFAT. NFAT roman al citoplasma i per tant és incapaç d'activar els gens implicats en la proliferació de les cèl·lules T com per exemple la IL-2, produint així la immunosupressió (Handschumacher R.E. et al., 1984; Shreiber S.L. et al., 1991).

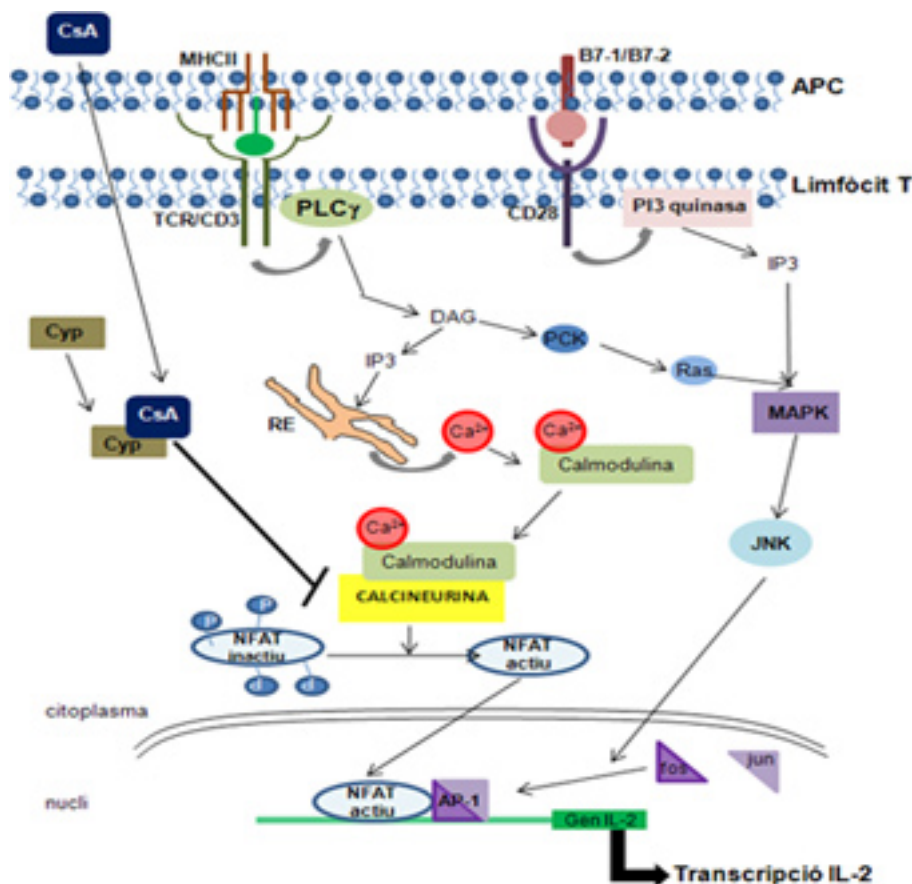


Figura 9. Senyals intracel·lulars generats en l'activació del limfòcit T. Breument, l'activació de la cèl·lula T a través del TCR/CD3 i dels senyals coestimuladors (CD28) mobilitzen el calci intracel·lular i activen les MAPK per finalment activar l'expressió de gens implicats en l'activació i proliferació de les cèl·lules T com per exemple la IL-2. La CsA al unir-se amb el seu receptor intracel·lular, la ciclofilina, inhibeix l'activitat fosfatasa de la calcineurina, impedit en últim terme la transcripció d'aquests gens.

2.4. NEFROTOXICITAT CAUSADA PER LA CSA

Malgrat la seva utilitat com immunosupressor en el trasplantament d'òrgans i en el tractament de malalties autoimmunes, la utilització de la CsA es troba limitada pels nombrosos efectes secundaris que provoca entre els quals es destaca la toxicitat renal, neurològica i hepàtica, la hipertensió, la hiperlipidèmia, etcètera (Rezzani R., 2004). La nefrotoxicitat, però, és l'efecte secundari més comú, causant la pèrdua de la funció renal (Bennett W.M. et al., 1983; Parra Cid T. et al., 2003).

Tot i que el mecanisme d'acció de la CsA sobre el sistema immunitari ha estat ben caracteritzat, es coneix molt poc sobre els mecanismes teixit i cèl·lula específics implicats en el dany renal produït per la CsA.

La nefrotoxicitat causada per la CsA implica dues formes de dany renal clarament diferenciades:

LA NEFROTOXICITAT AGUDA: Apareix durant les primeres setmanes o mesos del tractament i es caracteritza per una vasoconstricció intrarenal, que té lloc bàsicament a l'arteriola aferent, i per una disfunció tubular renal.

La vasoconstricció produïda per la CsA està correlacionada amb l'alteració dels nivells de vasoconstrictors i de vasodilatadors. Aquesta, és el resultat d'una davallada del flux sanguini renal, una reducció de la taxa de filtració glomerular i un augment de la resistència vascular renal. S'ha demostrat que tots aquests esdeveniments són produïts per un augment de la producció d'endotelina-1, tromboxans, prostaglandines i angiotensina II, una reducció de la síntesi i secreció d'òxid nítric per les cèl·lules endotelials, un augment de la concentració de calci intracel·lular i de radicals lliures i l'activació del sistema nerviós simpàtic. (Thomas S.E. et al., 1998; Fellström B. 2004; Busauschina A. et al., 2004; Cattaneo D. et al., 2004; Tse K.C. et al., 2002) (FIGURA 10).

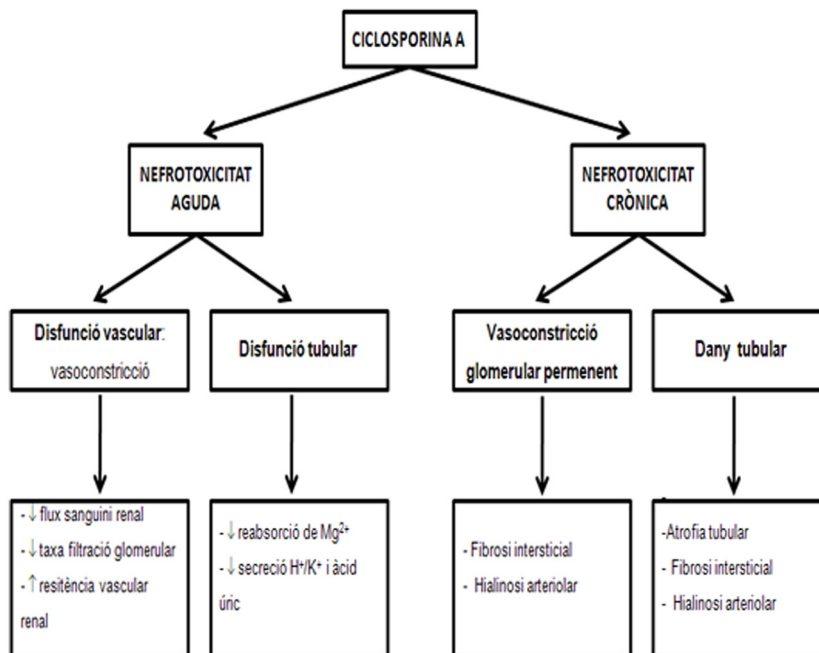


Figura 10. Manifestacions de la nefrotoxicitat causada per la CsA. Esquema dels efectes aguts i crònics causats per la CsA.

Per altra banda, la disfunció tubular es caracteritza per una disminució de la reabsorció de Mg^{2+} i una disminució de la secreció K^+/H^+ i d'àcid úric (Tse K.C. et al., 2002) produint una pertorbació del transport en el túbul renal distal de la nefrona alterant així l'equilibri àcid-base del mateix.

Aquests són fenòmens reversibles, de manera que quan es redueix o es suspèn el tractament amb CsA es recupera la funció renal.

LA NEFROTOXICITAT CRÒNICA: És la combinació dels esdeveniments que provoquen una vasoconstricció pre-glomerular permanent amb els mecanismes que actuen directament sobre les cèl·lules epitelials tubulars donant lloc a una fibrosi intersticial, hialinosi arteriolar i atrofia tubular que produeixen en últim terme la fallada renal irreversible (Mihatsch M.J. et al., 1998; Cattaneo D. et al., 2004) (FIGURA 10).

Els mecanismes que desencadenen la fibrosi intersticial no es coneixen amb profunditat. En part, la vasoconstricció crònica amb una distribució de l'oxigen deteriorada podria contribuir a la fibrosi (Kopp J.B. et al., 1990). S'ha demostrat també en animals i cèl·lules del túbul proximal tractats amb CsA un augment de l'expressió renal de l'mRNA de diferents col·làgens. Aquest efecte sobre la

inducció del col·lagen es deu en part, per un increment de l'expressió del TGF- β renal en presència de CsA (Wolf G. et al., 1995). Altres autors han implicat el TGF- β en la progressió de malalties renals (Klarh S. et al., 1995) ja que és capaç d'induir en cèl·lules un augment de la matriu extracel·lular i disminuir la producció de proteases degradadores de la matriu extracel·lular (Massagué J. 1990). Rates tractades amb CsA pateixen un augment dels nivells de l'mRNA de TGF- β 1 causant un augment de l'expressió del col·lagen

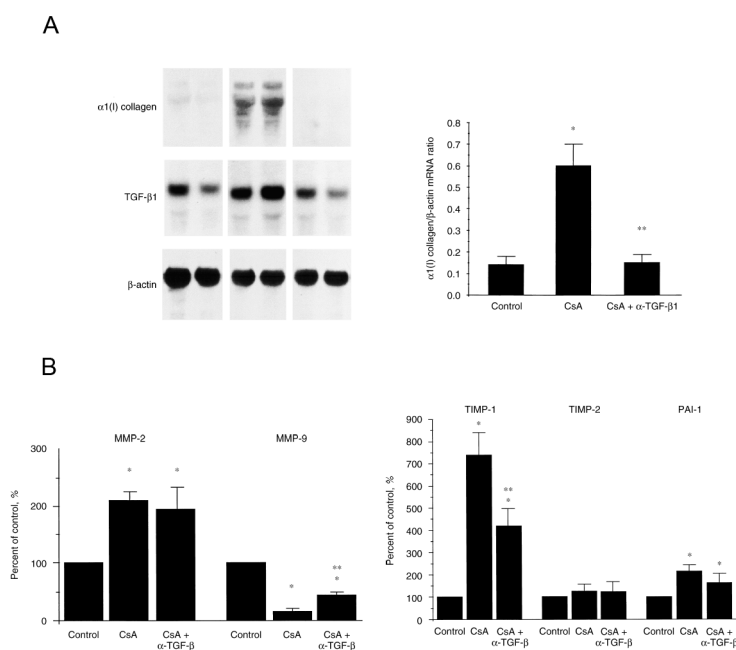


Figura 11. La CsA i el TGF- β . La CsA induïx un augment de l'expressió de l'mRNA de l' $\alpha(I)$ -col·lagen. El tractament amb l'anticòs anti-TGF- β en redueix la seva expressió. (A) Anàlisi de l'expressió de l'mRNA de l' $\alpha(I)$ -col·lagen, el TGF- β i la β -actina de ronyons de rata control, de rates tractades amb CsA i de rates tractades amb CsA/ α -TGF- β (panell de l'esquerre). L'anàlisi quantitatiu (n=7 mostres per grup) demostra un augment de la relació $\alpha(I)$ -col·lagen/ β -actina respecte el control. El tractament amb l'anticòs anti-TGF- β , normalitza l'expressió del col·lagen. (panell de la dreta) *p < 0.05 vs control, ** p < 0.05 vs CsA.

(B) El tractament amb anticòs α -TGF- β evita la disminució de l'expressió de MMP-9 induïda per la CsA (panell de l'esquerre) i atura l'augment de l'expressió de TIMP-1 però no de PAI, causada per la CsA (panell de la dreta).

de tipus I i de la proteïna TIMP-1 (*tissue inhibitor metalloproteinase-1*) i una disminució de l'expressió de la MMP-9 (*matrix metalloproteinase-9*). Quan aquestes rates es tracten amb anticòs anti-TGF- β 1

s'evita l'estimulació del col·lagen tipus I, es restableixen els nivells normals de TIMP-1 i MMP-9 i inhibeix el desenvolupament de la hialinosis arteriolar (Islam M. et al., 2001) (FIGURA 11). Posteriorment utilitzant un model de rosegador amb nefrotoxicitat induïda per CsA, s'ha demostrat com el tractament amb anti-TGF- β redueix els nivells d'mRNA de TGF- β , col·lagen i fibronectina (Khanna A.K. et al., 2004). L'angiotensina II presenta també un rol importat en la nefrotoxicitat crònica produint fibrosi renal mitjançant l'activació de fibroblasts i estimulant la síntesi d'osteopontina, de TGF- β , fibronectina i col·lagen del tipus I (Ruiz-Ortega M. et al., 1997). Es coneixen doncs, varis mediadors responsables d'aquesta toxicitat renal irreversible com són el factor de creixement transformant (TGF- β), el factor de creixement derivat de plaquetes (PDGF), el factor de creixement de fibroblasts (FGF) i el factor de necrosi tumoral alfa (TNF- α) (Fellström B., 2004).

Els mecanismes que causen la toxicitat renal crònica són multifactorials en el què hi estan implicats el glomèrul, l'epiteli tubular, l'interstici renal i la vascularització (Burdmann E. A. et al., 2003).

A nivell cel·lular, la toxicitat renal es caracteritza per la formació de vacuoles al citoplasma i un augment de volum del reticle endoplasmàtic de les cèl·lules S3 del túbul proximal (Mihatsch M.J. et al., 1986), fibrosi intersticial i un engruiximent de la membrana basal de les cèl·lules del túbul (Myers B.D. et al., 1984). Varis grups han demostrat que elevades concentracions de CsA (μ M) provoquen necrosi a les cèl·lules tubulars, mentre que dosis baixes del fàrmac (nM) donarien lloc a una mort cel·lular per apoptosi (Healy E. et al., 1998; Ortiz A. et al., 1998; Bakker R.C. et al., 2002; Justo P. et al., 2003). Abans de la mort cel·lular, cèl·lules tubulars renals tractades amb CsA presenten una aturada del cicle cel·lular amb un augment del percentatge de cèl·lules a la fase G0/G1 coincidint amb un augment de l'expressió de la proteïna p53 (Lally C. et al., 1999). En cèl·lules HK-2, la CsA causa una reducció de la llargada dels telòmers i un augment de la fosforilació de la Ser15 de la p53 que implica un augment dels nivells de l'mRNA de l'inhibidor de cicle cel·lular p21 aturant el cicle cel·lular a la fase G0/G1. Paral·lelament la CsA induïx la producció de H₂O₂ que degrada el DNA i podria contribuir en l'escurçament dels telòmers causant senescència cel·lular. Quan aquestes cèl·lules es tracten amb CsA i s'afegeix catalasa al medi extracel·lular, que trenca específicament el H₂O₂, es redueix la citotoxicitat induïda per CsA i s'atenua l'efecte sobre la proliferació cel·lular, síntesi de DNA i l'escurçament dels telòmers (Jennings P. Et al., 2007) (FIGURA 12). Recentment s'ha observat que en cèl·lules PCT3 la mort cel·lular induïda per la CsA (a partir de 10 μ g/ml) té lloc activant determinades isoformes de fosfoinositol 3-quinasa (PI3K) mitjançant l'activació del receptor del factor de creixement epidèrmic (EGFR) (Sarró E. et al., 2007). Experiments *in vivo* demostren que l'administració de CsA en rates augmenta l'expressió de p53 i Bax, augmenta l'activitat de la caspasa-3 i disminueix l'expressió de Bcl-2 a la primera setmana de tractament i es manté fins a la quarta setmana on incrementen el nombre de cèl·lules apoptòtiques, fet que correlaciona amb l'atrofia tubular i la fibrosi intersticial (Shihab F.S. et al., 1999). Recentment, també s'ha demostrat que el tractament de cèl·lules mesengials amb CsA induïx apoptosi. Aquesta es deu a un augment de la regulació dels factors proapoptòtics caspases 3 i 6, p53 i Bax i a una disminució de la regulació dels factors antiapoptòtics Bcl-2 i IAPs (*inhibitors apoptosis proteins*) (Han S.Y. et al., 2006).

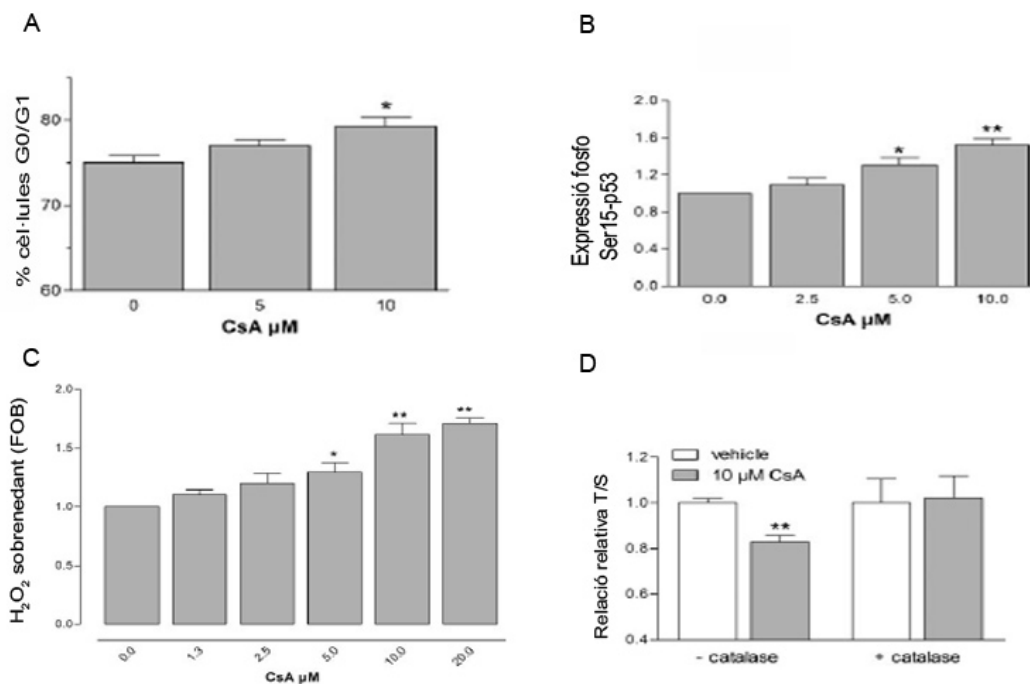


Figura 12. La CsA induïx senescència a les cèl·lules HK-2. (A) La CsA para el cicle cel·lular en G0/G1, (B) produeix un augment de l'expressió de la proteïna p53 (C) induïx la producció d' H_2O_2 que contribueix notablement en l'escurçament dels telòmers. (D) Quan s'afegeix catalasa, que trenca específicament l' H_2O_2 redueix l'escurçament dels telòmers. L'allargada dels telòmers es determina mitjançant qRT-PCR utilitzant com a gen endogen el gen de còpia simple 36B4. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Estudis dirigits a esbrinar els efectes a nivell molecular causats per la CsA a la cèl·lula del túbul, demostren, que la CsA redueix la capacitat gluconeogènica dels túbuls proximals reduint l'activitat de la fosfoenolpiruvat quinasa renal (PEPCK). Aquest és un efecte òrgan específic ja que la CsA no altera l'activitat de la PEPCK hepàtica, suggerint que la CsA podria està inhibint l'activitat d'un factor de transcripció específic de ronyó (Morris S.M. et al., 1992). Estudis *in vivo* i *in vitro* demostren que la CsA inhibeix la bomba de Na^+/K^+ -ATPasa i altera l'absorció de K^+ en cèl·lules de túbuls proximals (Ferrer-Martínez A. et al., 1996; Deppe C.E. et al., 1997). La CsA augmenta els nivells d'mRNA i proteïna de l'osteopontina en teixits renals. Aquesta produeix un efecte estimulador sobre els fibroblasts i els elements de la matriu extracel·lular (Khanna A. 2005). En cèl·lules messengials, la CsA redueix el contingut de MMP-9 (*matrix metalloproteinase 9*) mitjançant la inhibició de la via de senyalització de les JNK que impedeix la transcripció de MMP-9 dependent de *NFkappaB* produint l'acumulació d'elements de la matriu extracel·lular un dels causants de la fibrosi (Doller A. et al., 2007).

Malgrat la seva coneguda i reportada participació en el mecanisme d'immunosupressió dels limfòcits T, tant els NFAT com la calcineurina estan implicats en molts altres processos. A continuació se'n detallen alguns.

Els **NFAT**. Descrits per primera vegada als limfòcits T com a factors de transcripció del gen de la IL-2. També s'ha vist que poden activar la transcripció d'altres citoquines com la IL-3, IL-4 i IL-5, l'interferó γ , el lligand de FAS entre d'altres durant la resposta immunològica de la cèl·lula T (Rao

A. et al., 1997; Holtz-Heppelmann C.J. et al., 1998). Existeixen cinc isoformes de NFAT. NFAT1, NFAT2 (NFATc), NFAT3, NFAT4 i NFAT5. Tot i que originàriament es considerava que la distribució dels NFAT era exclusiva del limfòcit T, en els darrers temps han aparegut noves dades sobre la seva expressió en altres teixits. Així s'ha descrit la presència d'NFAT3 a cor (Molkentin J.D. et al., 1998) i a l'epiteli pulmonar (Dave V. et al., 2004), d'NFAT2 a cèl·lules precursors de la vàlvula cardíaca (Molkentin J.D. et al., 1998) i d'una nova isoforma d'NFAT1 al cervell (Plyte S. Et al., 2001). En tots aquests teixits s'ha demostrat la funcionalitat del factor de transcripció, però també s'ha descrit la presència d'mRNA de diferents isoformes d'NFAT en altres teixits sense demostrar l'existència de proteïna ni activitat transcripcional com per exemple l'expressió a ronyó d'mRNA d'NFAT3 i NFAT4 (Hoey T. et al., 1995). Darrerament però s'ha demostrat la presència de l'NFAT2 en cèl·lules messengials del glomèrul i que aquest està implicat en la regulació de l'expressió de la COX-2 en aquestes mateixes cèl·lules (Sugimoto T. et al., 2001). La CsA inhibeix l'expressió de la COX-2 en ronyó, fet que suggereix la importància de l'NFAT en la disfunció renal produïda per la CsA (Höcherl K. et al., 2002). També en cèl·lules messengials del glomèrul s'ha reportat que la isoforma NFATc1 amb cooperació amb els factors de transcripció Sp1/Sp3 i Egr-1 modulen l'expressió de MT1-MMP (*membrane type 1 matrix metalloproteinase*). Aquest enzim participa en els processos proteolítics que es donen durant la inflamació glomerular aguda. La inhibició de la seva expressió per la CsA podria estar implicada en el desenvolupament de la fibrosi intersticial que provocada pel fàrmac immunosupressor. (Alfonso-Jaume M.A. et al., 2004). La policistina-1 (PC-1) és un receptor de membrana implicat en les interaccions cèl·lula-cèl·lula, cèl·lula-matriu extracel·lular i en maduració i diferenciació epitelial. En cèl·lules embrionàries renals HEK293 i en cèl·lules de tubs col·lectors corticals MC-1, està implicada en l'activació de la PLC que augmenta els nivells de calci intracel·lular induint l'activació de la calcineurina i per tant la defosforilació i translocació de l'NFAT al nucli. També es demostra que l'expressió de NFAT en ronyó adult es dona majoritàriament en cèl·lules epitelials tubulars (Puri S. et al., 2004).

La **CALCINEURINA** també s'expressa a ronyó i la seva activitat fosfatasa en aquest òrgan està implicada en una gran varietat de processos. La subunitat A de la calcineurina està formada per 3 isoformes α , β i γ l'expressió de les quals varia en funció del segment de la nefrona. Així, en els túbuls proximals l'expressió de la subunitat α és quatre vegades superior que l'expressió de la subunitat β . L'activitat fosfatasa de la calcineurina és 10 vegades superior en el túbul proximal que en altres segments de la nefrona coincidint amb l'expressió predominant de la isoforma α (Tumlin J.A., 1995 i 1997). La isoforma α es creu com un possible mediador dels efectes tòxics renals associats als inhibidors de la calcineurina (Gooch J.L. et al., 2007). La calcineurina, en els túbuls proximals i distals, estimula l'activitat basal de l'ATPasa de Na⁺/K⁺ (Tumlin J.A., 1997). Igualment s'ha descrit la participació de la calcineurina en vies de senyalització de receptors dopaminèrgics i adrenèrgics, del receptor de l'angiotensinogen I, de mineralocorticoides i de glucocorticoides (Tumlin J.A., 1997). La calcineurina participa en vies de transducció del senyal reguladores de l'homeòstasi renal dels

fosfats extracel·lulars (Moz Y. et al., 2004). La calcineurina és important pel desenvolupament i la correcta diferenciació terminal del ronyó ja que l'administració de CsA durant el procés de nefrogènesi provoca una disminució en el nombre de nefrones i una alteració en la maduració postnatal del ronyó (Tendron A. et al., 2003). Ratolins *Knock-out* per la isoforma α de la calcineurina A presenten una maduració anormal de la zona nefrogènica i del glomèrul, pèrdua de cèl·lules messengials, alteracions del cicle cel·lular, augment de la deposició de col·lagen i un augment dels nivells de creatinina en sèrum indicatiu d'una funció renal danyada (Gooch J.L. et al., 2004-1). Aquest mateix grup demostra principis del 2007 que la subunitat α de la calcineurina regula la fibrosi i l'expressió de TGF- β , ja que la pèrdua d'aquesta subunitat reproduïx els efectes nefrotòxics induïts per la CsA *in vivo* i *in vitro* (Gooch J.L. et al., 2007). L'activació de TGF- β per part de la calcineurina produeix una acumulació de proteïnes de la matriu extracel·lular. La generació d'espècies reactives d'oxigen (ROS) i la modulació dels nivells de Ca^{2+} per part del TGF- β són mecanismes imprescindibles per activar la calcineurina (Gooch J.L. et al., 2004-2). Recentment s'ha demostrat que l'activació de la prolina oxidasa (POX) induïda per la p53 genera ROS que promou la mobilització de Ca^{2+} i per tant l'activació de la calcineurina. L'activació de factors de transcripció regulats per la calcineurina poden afectar a l'expressió de gens regulen el cicle cel·lular i l'apoptosi dependent de p53 (Rivera A. et al., 2005).

2.5. ALTRES IMMUNOSUPRESSORS

Els fàrmacs immunosupressors es poden classificar segons els seu mecanisme d'acció. Així, trobem els inhibidors de citoquines (els glucocorticoides, la ciclosporina A, l'FK506, la rapamicina, etcètera) i els inhibidors de la síntesi del DNA com el micofenolat mofetil o l'*azatioprine*.

TACROLIMUS (FK506): macròlid derivat del fong *Streptomyces tsukubaensis* descobert al 1987 per Goto T. et al. L'FK506 inhibeix la calcineurina després d'unir-se al seu receptor intracel·lular *FK Binding Protein* (FKBP). Tot i que el mecanisme d'immunosupressió és molt similar al de la CsA (vegeu els apartats 2.2 i 2.3 de la INTRODUCCIÓ) presenten una estructura molecular molt diferent (FIGURA 13).

La toxicitat renal produïda pel tacrolimus és similar a la provocada per la CsA. L'FK506 a més presenta activitat neuroprotectora independent a la inhibició de la calcineurina.

SIROLIMUS (Rapamicina): macròlid derivat del fong *Streptomyces hygroscopicus*. El sirolimus és un potent inhibidor de la proliferació de cèl·lules T i B i de la producció d'anticossos. Tot i que el sirolimus comparteix semblances estructurals amb l'FK506 i s'uneix a receptors de la mateixa família, el mecanisme d'acció és completament diferent (FIGURA 13). El sirolimus s'uneix al receptor intracel·lular FKBP12. Aquest complex bloqueja l'activació de la quinasa específica de cicle cel·lular TOR bloquejant la progressió del cicle cel·lular entre les fases G1 i S (Sehgal S.N. et al., 2003). La CsA i el sirolimus actuen sinèrgicament en la inhibició de la proliferació de les cèl·lules B i T.

MICOFENOLAT MOFETIL: és un inhibidor de la síntesi de les purines que de manera selectiva i reversible inhibeix la ionosina-monofosfat deshidrogenasa (IMPDH), enzim clau en la proliferació dels limfòcits T i B. El micofenolat mofetil *in vivo* es converteix en àcid micofenòlic que és la forma activa. Quan s'utilitza conjuntament amb la CsA millora la supervivència de l'òrgan trasplantat. (Ojo A.O. et al., 2000).

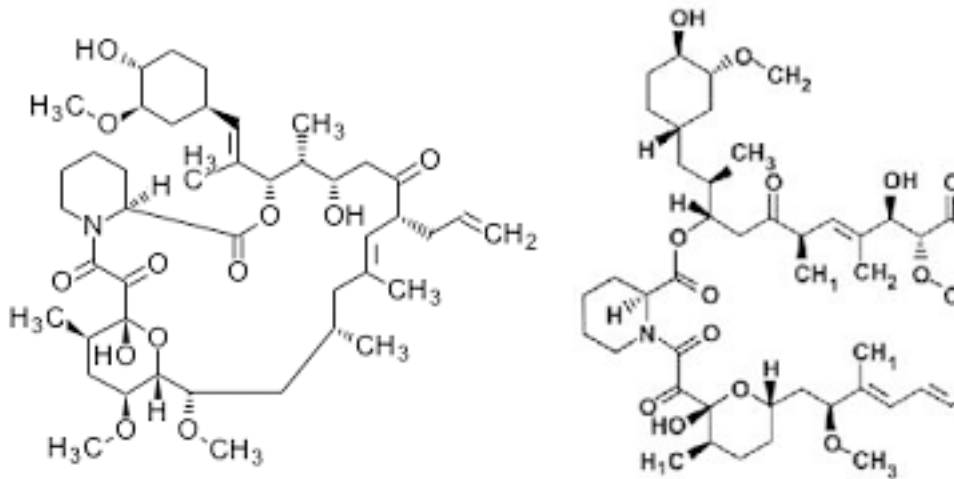


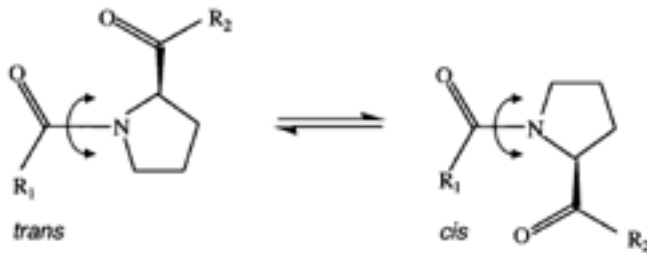
Figura 13. Altres immunosupressors. Estructura química del tacrolimus (FK506) (esquerra) i del Sirolimus (rapamicina) (dreta).

Ja fa quasi 30 anys que van començar els primers assajos clínics amb la CsA. Durant molt temps la CsA ha sigut l'immunosupressor més utilitzat per prevenir el rebuig d'òrgans en un ampli ventall de trasplantaments. No obstant, la toxicitat renal s'ha convertit en l'efecte secundari més indesitjat. Per aquest motiu, es van començar a utilitzar les teràpies combinades. Aquestes es basen en la combinació de la CsA o altres inhibidors de calcineurina (FK506) amb micofenolat mofetil o sirolimus, amb corticoesteroides, amb anticossos monoclonals anti- IL-2 o amb anticossos policlonals. La reducció de la dosi de CsA, millora a curt termini la funció renal però no protegeix del rebuig de l'òrgan trasplantat (Lloveras J., 2004; Fellström B. 2004; Ponticelli C. et al., 2004). Per tot això, calen nous estudis enfocats a determinar quins són els mecanismes moleculars en els quals participa la CsA, per induir el dany renal.

3. LES IMMUNOFILINES

3.1. ASPECTES GENERALS

Les immunofilines són un superfamília de proteïnes altament conservades que es caracteritzen per la capacitat de catalitzar la isomerització cis/trans de les unions peptidil-prolil sense que hi hagi trencament de la cadena peptídica ni formació d'enllaços covalents (FIGURA 14).



Els primers membres d'aquesta superfamília es van identificar en base a la seva capacitat per unir-se a fàrmacs immunosupressors com la CsA, l'FK506 i la rapamicina. Les immunofilines es divideixen en tres grups de proteïnes segons el fàrmac al qual s'uneixen: les **ciclofilines** les

quals s'uneixen selectivament a la CsA, les **FKBP** (FK506 *Binding Proteins*) les quals s'uneixen tant al FK506 com a la rapamicina amb elevada afinitat i les **parvulines** les quals recentment s'ha demostrat que s'uneixen a la juglona (5-hidroxi-1,4-naftoquinona). Aquests tres grups de proteïnes tot i presentar activitat peptidil-prolil cis/trans isomerasa (PPIasa) no mostren similituds de seqüència ni estructurals. Dins de cada grup, tant les ciclofilines com les FKBP, mostren un alt grau de conservació estructural a través de l'evolució, suggerint un paper fonamental en les funcions cel·lulars (Galat A., 1993; Göethl S.F. et al., 1999).

3.2. LES CICLOFILINES

Són proteïnes ubiques molt conservades al llarg de l'evolució. Es poden trobar en bacteris, fongs, plantes i vertebrats i s'expressen en un ampli ventall de teixits (Göthel S.F. et al., 1999). Les diferents ciclofilines descrites comparteixen més d'un 50% d'homologia i difereixen amb la localització subcel·lular i l'afinitat per unir-se a la CsA. Tot i presentar activitat peptidil-prolil cis/trans isomerasa s'han descrit altres funcions per a cada una d'elles.

3.2.1. La ciclofilina A (CypA)

La CypA es descobrí originàriament com el lligand intracel·lular de la CsA a partir de melsa bovina (Handschumacher R.E. et al., 1984) i de manera independent per la seva activitat peptidil-prolil cis/trans isomerasa en el còrtex de ronyó porcí (Fisher G. et al., 1984). La CypA es troba altament conservada entre diferents espècies, presentant un 26% de identitat entre la CypA humana i la d'*Escherichia coli* i un 64% d'identitat amb el *Saccharomyces cerevisiae* (Colgan J. et al., 2000).

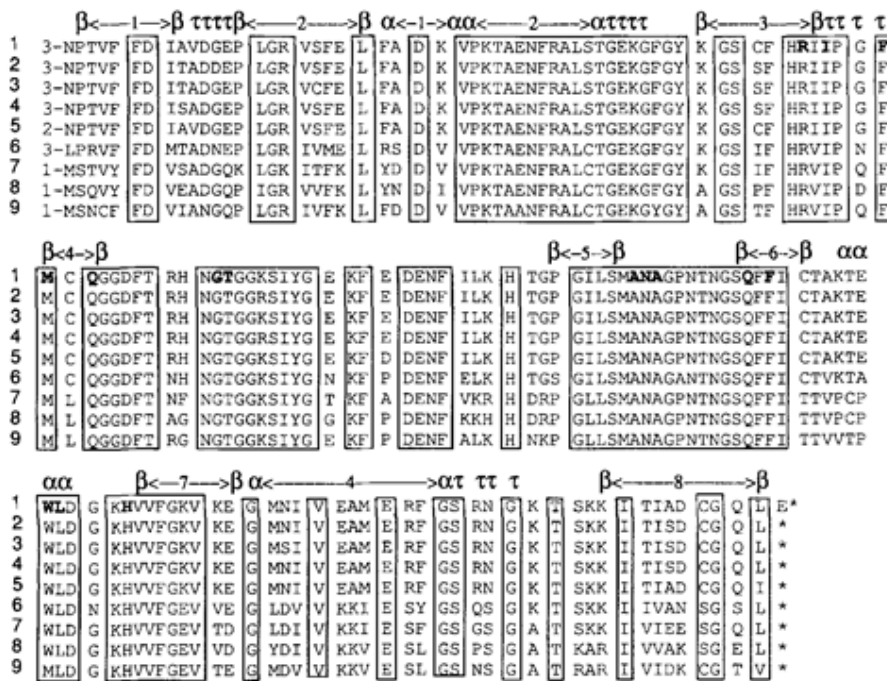


Figura 15. Alineament de seqüències de diferents membres de la família de la CypA. Les seqüències de CypA corresponen (1) humà, (2) ratolí, (3) rata, (4)hàmmster xinès, (5) porc, (6) *Drosophila melanogaster*, (7) *Candida albicans*, (8) *Saccharomyces cerevisiae* i (9) *Saccharomyces pombe*. Les lletres gregues indiquen el tipus d'estructura secundària. (α) alfa hèlix, (β) cadena beta, (τ) loops i () extensions de les cadenes. (Extret i modificat de Galat A. et al., 1993).

Estudis de cristal·lografia revelen una estructura de barril amb 8 làmines β antiparal·leles, dues cadenes α-hèlix col·locades una a cada banda del barril i una butxaca hidrofòbica que serveix de centre actiu per l'activitat PPIasa i de lloc d'unió per la CsA (Ke H.M. et al., 1991; Mikol V. et al., 1993) (FIGURA 15).

La Cyp A té un pes molecular d'uns 18 kDa i es localitza de manera predominant al citoplasma de les cèl·lules, representant un 0,4% del total de proteïna d'aquest compartiment cel·lular (Harding M.W. et al., 1986). Estudis amb *Saccharomyces cerevisiae* demostren que la CypA es localitza tant al citoplasma com al nucli de la cèl·lula (Huh W.K. et al., 2003; Arevalo-Rodríguez M. et al., 2005). Treballs posteriors amb mamífers demostren la localització citoplasmàtica i nuclear de la CypA en varis òrgans i teixits (FIGURA 16). Particularment es troben alts nivells de CypA al ronyó i dins d'aquest la seva distribució no és uniforme ja que les cèl·lules tubulars epitelials contenen més cyPA que el glomèrul i altres estructures (Marks W.H. et al., 1991; Ryffel B. et al., 1991; Le Hir M. et al., 1995; Chiu R. et al., 2003). Tot i l'existència de nombrosos estudis per determinar les múltiples funcions intracel·lulars de les ciclofilines, s'ha demostrat que també poden funcionar com a mediadors de les comunicacions intercel·lulars. S'han trobat alts nivells de CypA en diversos fluids biològics en resposta a estímuls inflamatoris com per exemple en sèpsia severa (Tegeder I. et al., 1997), en infecció per HIV (Endrich M.M. et al., 1998), en estrès oxidatiu (Jin Z.G. et al., 2000) i en artritis reumàtica (Billich A. et al., 1997). La presència extracel·lular de CypA suggereix l'existència de proteïnes de membrana cel·lular capaces d'interaccionar amb la ciclofilina i activar certes respostes biològiques a través d'aquesta unió. Yurchenko i col. identifiquen el CD147 com a receptor de senyalització per a la CypA (Yurchenko V. et al., 2002). El CD147 és una glicoproteïna integral de membrana de tipus I, també coneguda com el regulador de la producció de metal·loproteinases de la matriu EMMPRIN

(*Extracellular Matrix MetalloProteinase INducer*). Per a la senyalització induïda per la CypA a través del seu receptor CD147 cal la participació de glicosaminoglicans sulfat (GAGs). Aquests actuen com a primers receptors de les ciclofilines per complementar la interacció de baixa afinitat entre el CD147 i la Cyp de cèl·lules no activades. La prolina 180 i la glicina 181 són residus del domini extracel·lular del receptor CD147 essencials per a la senyalització i la quimiotaxis induïda per la CypA extracel·lular. També és crucial l'activitat PPlasa de la CypA, ja que mutants per aquesta activitat no inicien la cascada de senyalització (Yurchenko V. et al. 2002, Yurchenko V. et al., 2005).

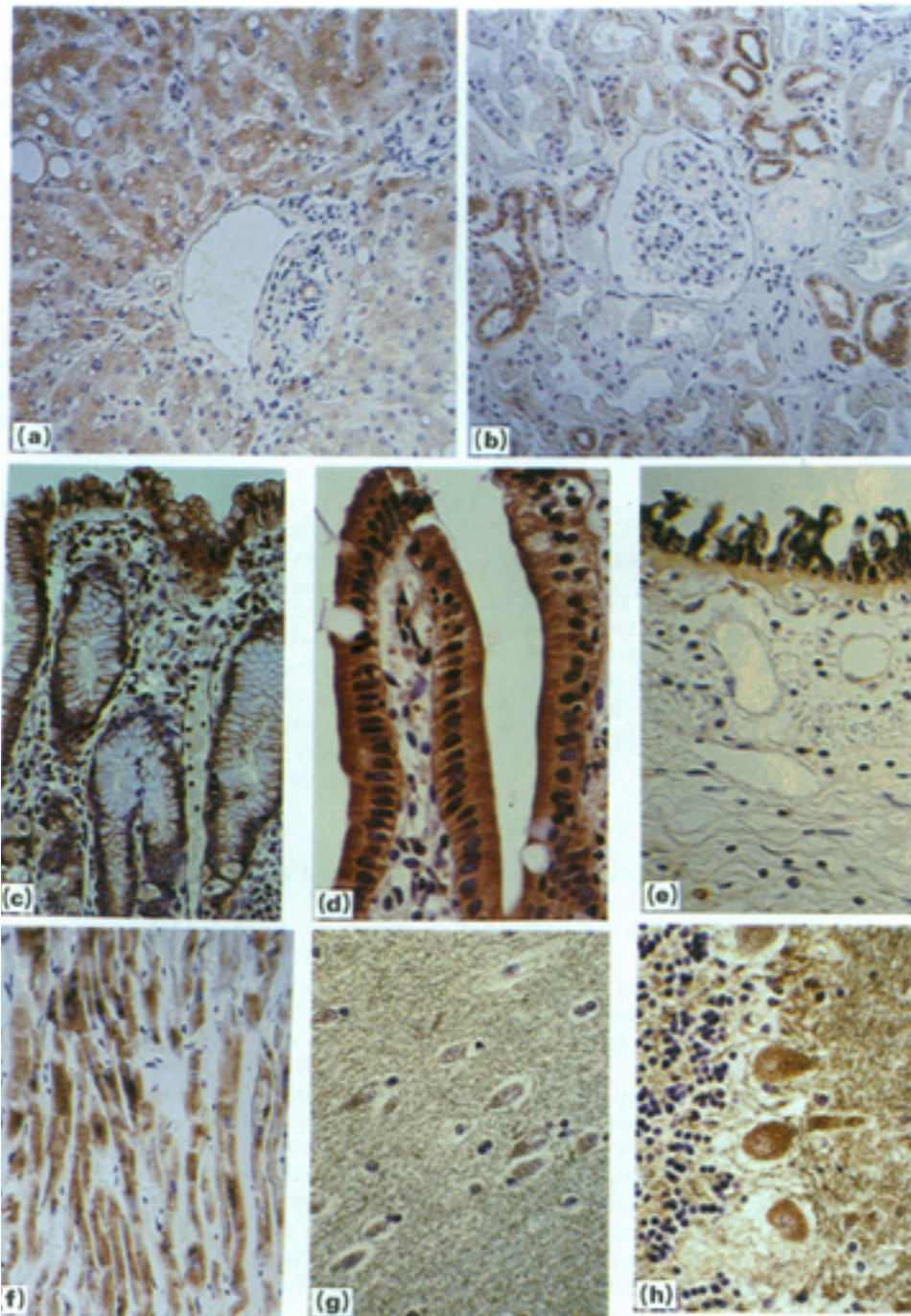


Figura 16. Distribució de la CypA en teixits humans. Els teixits inclosos en parafina i fixats en formaldehid es van tallar i incubar amb sèrum de conill anti-CypA. (a) fetge, (b) ronyó, (c) colon, (d) ílium, (f) tràquea, (g) múscul cardíac i (h) còrtex cerebral. (Extret i modificat de Ryffel B. et al., 1991).

ACTIVITAT NUCLEASA I APOPTOSI

La NUC18 és una nucleasa de 18 KDa aïllada de timòcits de rata en apoptosi que presenta una elevada similitud de seqüència i estructura amb les ciclofilines (Gaido M. et al., 1991; Montague J.W. et al., 1997). A partir d'aquest descobriment s'ha assajat i avaluat l'activitat nucleasa de les ciclofilines així com el seu possible rol en l'apoptosi. Així, la CypA presenta una activitat nucleasa dependent de Ca^{2+} i de Mg^{2+} i bloquejada en presència de zinc i d'àcid aurintricarboxílic tal i com es va descriure per la NUC18 (Montague J.W. et al., 1994). Les ciclofilines generen extrems 3'-OH en el DNA, extrems que corresponen als que es formen durant el procés d'apoptosi. Són capaces de degradar una àmplia varietat de substrats de DNA i poden generar fragments de 50 Kb a partir de cromatina, observats també durant el procés d'apoptosi. A més l'activitat nucleasa és independent de l'activitat PPIasa i no s'inhibeix en presència de CsA (Montague J.W. et al., 1997).

Per tècniques de *pull-down*, coimmunoprecipitació, modelatge molecular i espectrometria de masses es determina la interacció de CypA amb el factor inductor d'apoptosi (AIF). També s'ha demostrat que ambdues proteïnes col·localitzen al nucli de la cèl·lula. La formació del complex CypA-AIF produeixen efectes sinèrgics en la degradació del DNA i en la inducció de la pèrdua de DNA sense implicació de l'activitat PPIasa (Candé C. et al., 2004). Estudis *in vitro* demostren que després de produir-se una isquèmia cerebral, l'AIF interacciona amb la CypA. El complex AIF-CypA entra al nucli participant en la cromatinolisi i contribuint a la mort cel·lular (Zhu C. et al., 2007).

INFECCIÓ PER VIRUS

Estudis de dos híbrids demostren que tant la CypA com la CypB interaccionen amb la poliproteïna Gag i la proteïna de la càpside p24 del virus de la immunodeficiència humana tipus-1 (HIV-1). La CsA interromp eficientment la interacció Cyp-Gag. Per bloquejar la interacció CypB-Gag cal una concentració de fàrmac 10 vegades superior a la necessària per interrompre la unió de la proteïna Gag amb la CypA (Luban J. et al., 1993). La CypA s'incorpora específicament als nous virions de HIV-1 interaccionant amb la Gag, aquesta incorporació és essencial per la correcta infecció (Franke E.K. et al., 1994; Sherry B. et al., 1998). S'ha demostrat que la CypA regularia l'acoblament i l'entrada dels virions a les cèl·lules T i macròfags unint-se al seu receptor CD147 i/o als glicosaminoglicans (GAGs). La interacció amb els GAGs facilitaria la posterior unió amb el CD147 (Pushkarsky T. et al., 2001; Yurchenko V. et al., 2002). Recentment s'ha observat que la CypA interacciona amb la proteïna Gag de diferents tipus de lentivirus: el virus de la immunodeficiència felina -FIV- i el virus dels simis verds procedents de la sabana Africana -SIVagmTAN- (Lin T.Y. et al., 2006).

ACTIVITAT PPIasa I PLEGAMENT PROTEIC

L'activitat PPIasa de les diferents immunofilines s'ha involucrat en processos de plegament de proteïnes. La catàlisi enzimàtica dels passos lents en el procés del plegament proteic, com la isomerització cis/trans de les unions peptidil-prolil, suposa un avantatge ja que disminueix el risc de degradació proteolítica de proteïnes parcialment plegades i evita l'agregació (Fischer G. et al., 1990). La CypA s'ha demostrat que participa en el procés de formació de la triple hèlix de procòlagen I. Aquest procés es veu alentit per la presència de la CsA (Steinmann B. et al., 1991).

PROCESSOS INFLAMATORIS I PROLIFERATIUS

Tal i com s'ha esmentat anteriorment, durant els processos inflamatoris la CypA es secreta al medi extracel·lular. En el cas de l'artritis reumatoide (AR) existeix una correlació directa entre els nivells de CypA i el nombre de neutròfils del líquid sinovial dels pacients (Billich A. et al., 1997). Recentment s'ha demostrat que la CypA extracel·lular s'uniria al receptor CD147 amb presència de GAGs activant la cascada de senyalització de la ERK1/2 induint la proliferació cel·lular (Yurchenko V. et al., 2002). Quan les cèl·lules es tracten amb anticossos anti-CD147 o antagonistes del receptor s'observa una disminució de la quimiotaxis suggerint que la unió CypA-CD147 és la responsable de la invasió cel·lular en AR (Zhu P. et al., 2005).

Estudis *in vitro* demostren que la CypA extracel·lular produeix quimiotaxis de monòcits, neutròfils, eosinòfils humans i cèl·lules T (Yurchenko V. et al., 2002; Xu Q. et al., 1992). A més, quan s'injecta CypA *in vivo* produeix un reclutament de neutròfils induint una ràpida resposta inflamatòria (Sherry B. et al., 1991).

La CypA s'uneix a receptors de membrana dels LT-CD4⁺ produint un alliberament de calci intracel·lular (Sherry B. et al. 1998) responsable de la proliferació dels limfòcits T.

ESTRÉS OXIDATIU

Les espècies reactives d'oxigen (ROS) han estat implicades en la patogènesi de malalties vasculares com la hipertensió i l'aterosclerosi. En provocar un estrès oxidatiu en cèl·lules de la musculatura llisa vascular (VSMC) es dona la secreció de factors autocrins entre ells la CypA causant de l'estimulació de la ERK1/2 -implicada en una àmplia varietat de processos cel·lulars com creixement, diferenciació o proliferació cel·lular- i de la síntesis del DNA (Jin Z.G. et al., 2000). El tractament de cèl·lules endotelials (EC) amb CypA recombinant estimula l'activació de les MAPK (*mitogen-activated protein kinase*), l'activitat transcripcional de NF- κ B i l'expressió de molècules d'adhesió suggerint que la CypA secretada per l'endoteli vascular actuaria com una citoquina inflamatòria donant lloc a la progressió de l'aterosclerosi (Jin Z.G. et al., 2004). Recentment s'ha demostrat que la CypA presenta un efecte mitogènic sobre diferents línies cel·lulars endotelials vasculares que altera l'expressió de varis gens indicant un possible rol multifuncional de la CypA en les malalties vasculares (Yang H. et al., 2005).

Contràriament la CypA en cardiomiocits exerceix un efecte protector davant de l'estrès oxidatiu gràcies a la interacció i posterior activació de la proteïna antioxidant Aop1 (antioxidant protein 1). La CsA no altera l'activació de Aop1 indicant que la regió de la CypA responsable de la unió amb la Aop1 és diferent al lloc d'unió de la CsA (Doyle V. et al., 1999).

TRANSDUCCIÓ DE SENYALS DE CALCI

Quan la ciclofilina s'uneix a la CsA es forma un complex que interacciona i inhibeix l'activitat fosfatasa de la calcineurina. En últim lloc també es bloqueja el senyal dependent de calci provinent del receptor de la cèl·lula T (TCR) impedit així la transcripció del limfòcit T (Schreiber S.L. et al., 1992). Per tot això, el calci és un segon missatger essencial per a l'activació dels LT i s'ha suggerit que la

calreticulina està implicada en la mobilització del calci en l'activació del LT. S'ha demostrat que la calreticulina interacciona amb la CypA, implicant així la CypA en aquesta via de senyalització (Reddy P.A., 1999).

CREIXEMENT I DIFERENCIACIÓ NEURONAL

La CypA és una proteïna essencial durant la diferenciació neuronal induïda per àcid retinoic en cèl·lules p19EC (p19 *embryonal carcinoma cells*). L'eliminació de l'expressió gènica de la CypA afecta l'expressió de gens que contenen elements de resposta a l'àcid retinoic (Song J. et al., 2004). Alhora, l'àcid retinoic hiperfosforila la proteïna del retinoblastoma (RB) reguladora de la proliferació cel·lular, la diferenciació i l'apoptosi. En cèl·lules neuronals s'ha descrit que la translocació al nucli de la CypA, la hiperfosforilació de RB i l'augment de la formació del complex CypA-RB correlacionen amb la diferenciació neuronal induïda per l'àcid retinoic. La inhibició de l'expressió de CypA causa una disminució de la hiperfosforilació de Rb i de la diferenciació neuronal (Chiu R. et al., 2003).

CÀNCER

La CypA es troba sobreexpressada en càncer de pulmó (Campa M.J. et al., 2003). La eliminació de l'expressió de CypA en cèl·lules tumorals de pulmó mitjançant RNAi, afecta la proliferació cel·lular i l'apoptosi disminuint el creixement del tumor. La sobreexpressió de la CypA *in vivo* afavoreix una ràpida formació del tumor (Howard B.A. et al., 2005). Recentment s'ha reportat la sobreexpressió de CypA i CD147 en tres línies cel·lulars de càncer de pàncrees i en adenocarcinomes pancreàtics humans. La CypA estimula la proliferació de les cèl·lules activant la via de senyalització de les ERK1/2 i de la p38 mitjançant la unió amb el seu receptor CD147. El bloqueig del receptor, disminueix específicament l'efecte proliferatiu produït per la CypA (Li M. et al., 2006).

3.2.2. La ciclofilina B (CypB)

La CypB fou el segon membre de la família de les ciclofilines clonat i caracteritzat (Price E.R. et al., 1991). Mostra el 64% d'homologia amb la CypA i se'n distingeix per presentar extrems N i C-terminals específics. Així a l'extrem N-terminal presenta un pèptid senyal de 25 aminoàcids que dirigeix la proteïna a la via secretora mentre que a l'extrem C-terminal es descriu un senyal de retenció al reticle endoplasmàtic (Arber S. et al., 1992). Els 165 aminoàcids centrals contenen el domini d'unió a la CsA i el domini peptidil-prolil cis/trans isomerasa. L'estructura cristal·logràfica és similar a la de la CypA exceptuant dos *loops* que connecten les làmines β i les extensions N i C-terminals (Mikol V. et al., 1994) (FIGURA 17).

La ciclofilina B té un pes molecular de 21 kDa i es distribueix en tot tipus de cèl·lules i teixits sans amb una elevada expressió en cèl·lules d'origen limfoide (Price E.R. et al., 1991) i essent també molt abundant en ronyó sobretot en el túbul proximal contort (Kainer D.B. et al., 2000). El seu mRNA s'expressa també en diferents línies tumorals (Gomi S. et al., 1999). Estudis de localització subcel·lular demostren que la CypB en cèl·lules de cultiu es distribueix pel reticle endoplasmàtic, aparell de

Pèptid senyal

```

CypB 1  MKVLLAAALTAGSVFFLLLPGPSAADEKKKGPK 33
CypA 1  MWNPTVFPDLAVDGEPLGRVSEFLFADKVPKTAENFRALSTGEGKPGYKGS**CFHRIIPGM 61
      V  V+FD+ + E +GRV F LF VPKT +NF AL+TGEKGGYK S FHR+I FM
CypB 34  VTKVLYPDLRIGDEEDVGRVIFGLFGKTVPKTVDFVALATGEGKGGYKNSKPHRVIKDFM 93
CypA 62  QGGDFTRHNGTGGKSIYGEKPEDENFILKHTGPGILSMANAGPNTNGSQ#PFICTAKTEW 121
      QGGDFTR +GTGGKSIYGE+F DENF LKH GPG +SMANAG +TNGSQ#FFI T KT W
CypB 94  IQGGDFTRGDTGGKSIYGERPFDENFKLKHYPGWVSMANAGKDTNGSQ#FFITTVKTAW 153
CypA 122 LDGKHVVFGKVKEGMNI#VERME--RFGSR#NGKTS#KKIT#IADCGLE 165
      LDGKHVVFGKV EGM +V +E + SR+ K K + IADCG++E
CypB 154 LDGKHVVFGKVLGMEVVRKVESTKTD#SRD-KPLKDVIIADCGKIE 198

```

Figura 17. Alineament de CypA i CypB. Les lletres indiquen els residus idèntics, + els residus similars, utilitzant com a similars E ≈ D; R ≈ K i L ≈ I ≈ V ≈ M, * els aminoàcids implicats en l'activitat PPIasa i # els residus implicats en la unió amb la CsA. Els residus implicats en la unió amb GAGs estan subratllats. (Extret i modificat Bukrinski M., 2002).

Golgi i membrana plasmàtica. A la vegada que també es detecta en medi de cultiu. Alguns autors descriuen la presència de CypB al nucli cel·lular (Le Hir M. et al., 1995) a la vegada que també es demostra un senyal de localització nuclear (NLS) situat a l'extrem N-terminal de la proteïna madura (Rycyzyn M.A. et al., 2000). El tractament amb CsA altera el tràfic de la CypB per la via secretora, així s'observa una disminució de la proteïna al reticle endoplasmàtic i a l'aparell de Golgi. La CsA promou un augment de la taxa de secreció de la CypB, fenomen que explica el canvi de localització observat en presència del fàrmac (Price E.R. et al., 1994). La presència de CypB també s'ha descrit en altres fluids biològics com la llet (Spik G. et al., 1991) i el plasma (Allain F. et al., 1995) demostrant així la existència *in vivo* de la forma secretada de la CypB. La CypB secretada a la llet humana perd 5 aminoàcids de l'extrem C-terminal pertanyents a la seqüència de retenció a reticle endoplasmàtic. Diferents experiments suggereixen l'existència de peptidases específiques que dins el reticle o altres compartiments promourien la secreció (Mariller C. et al., 1996). La CsA administrada en pacients promou un augment de la CypB circulant a plasma de manera similar als efectes observats en diferents línies cel·lulars sotmeses a la presència de CsA en el medi de cultiu (Denys A. et al., 1998). Igualment que per a la CypA, la presència extracel·lular de la CypB suggereix l'existència de receptors cel·lulars. La recerca d'aquestes proteïnes ha portat a la identificació de diferents llocs d'unió per a la CypB en la membrana del limfòcit T. S'han descrit a la superfície del limfòcit T dos llocs d'unió a CypB: i) els de tipus I són receptors funcionals específics i condueixen la internalització del complex receptor-CypB. Dins aquest grup de receptors hi pertany el CD147. Aquesta unió és interferida per la CsA i altres ciclofilines (Allain F. et al., 1994; Allain F. et al., 1995, Pushkarsky T. et al., 2001; Yurchenko V. et al., 2002 i ii) els de tipus II fan referència als GAGs de la superfície del limfòcit T. És un tipus d'unió específica per a la CypB ja que la regió N-terminal de la proteïna madura és la responsable d'aquesta unió (Mariller C. et al., 1996).

ACTIVITAT NUCLEASA I APOPTOSI

La CypB també presenta activitat nucleasa dependent de Ca^{2+} i de Mg^{2+} i bloquejada en presència de zinc i d'àcid aurintricarboxílic com la NUC18 (Montague J.W. et al., 1994) (vegeu Activitat Nucleasa i apoptosi de la CypA). La CypB ha estat també implicada en la inducció de la degradació del DNA durant la mort cel·lular dels timòcits TCR-estimulats en els processos de selecció negativa que es donen en el timus (Nagata T. et al., 2000).

INFECCIÓ PER VIRUS

Com s'ha dit anteriorment la ciclofilina B interacciona amb la poliproteïna Gag i la proteïna de la càpside p24 del virus de la immunodeficiència humana tipus-1 (HIV-1) (vegeu Infecció per Virus de la CypA). A més la CypB és capaç d'interaccionar amb la proteïna Gag de la soca 239 del virus de la immunodeficiència en el simi (SIVMAC239) (Franke E.K. et al., 1994).

ACTIVITAT PPIasa I PLEGAMENT PROTEIC

L'activitat PPIasa de la CypB facilita el plegament del procol·lagen de tipus I en els primers estadis de la seva traducció evitant, junt amb altres proteïnes residents del reticle endoplasmàtic, l'agregació de les cadenes naixents. Aquesta associació de la CypB amb el procol·lagen es manté en les vesícules pre-Golgi suggerint que la CypB participa en l'exportació i secreció del col·lagen (Smith T. et al., 1995).

Les ciclofilines no només participen en el correcte plegament de proteïnes sintetitzades *de novo* sinó que també estan implicades en reparar proteïnes danyades per estrés tèrmic, radiació UV, canvis en el pH de la cèl·lula, tractament amb productes oxidants, etcètera. És el que es coneix amb el nom d'activitat xaperona. Aquesta activitat xaperona pot ser dependent o independent de l'activitat PPIasa. Així la CypB, juntament amb altres xaperones com la GRP94, la BiP i ERp72, s'associa al *pool* luminal de l'apolipoproteïna B (ApoB) del reticle endoplasmàtic i de l'aparell de Golgi, manifestant així els possibles rols en què participen aquestes xaperones sobre el plegament inicial o tardà de proteïnes que es donen en aquests compartiments subcel·lulars (Zhang J. et al., 2003). S'ha demostrat l'existència d'un complex multiproteic localitzat al reticle endoplasmàtic format per varies xaperones entres les quals hi trobem la CypB. Aquest complex s'associa a les cadenes pesades de la immunoglobulina parcialment plegades i no ensamblades. La formació d'aquest complex multiproteic també es dona en absència de síntesi de noves proteïnes, suggerint que aquestes xaperones es poden unir a substrats no plegats (Meunier L. et al., 2002).

PROCESSOS INFLAMATORIS I PROLIFERATIUS

S'han trobat alts nivells de CypB en diversos fluids biològics en resposta a estímuls inflamatoris com per exemple en sèpsia severa (Tegeder I. et al., 1997) o en infecció per HIV (Endrich M.M. et al., 1998). En el dany renal es produeix una inflamació aguda deguda, en part, a la secreció per part dels fibroblasts intersticials de factors quimiotàctics com la CypB. Així la CypB jugaria un paper important en el reclutament de leucòcits inflamatoris a l'interstici (González-Cuadrado S. et al., 1996). Recentment s'ha demostrat que la CypB és secretada per cèl·lules de càncer de pàncrees i es postula que actua com a antigen tumoral reconegut pels complexos de histocompatibilitat leucocitaris restringits i tumor-específics de les cèl·lules T citotòxiques. Calen més estudis per determinar el rol exacte d'aquesta molècula en càncer (Mauri P. et al., 2005).

En el limfòcit T, tant la CypA com la CypB extracel·lular, a través de la unió al seu receptor CD147 promouen els senyals de calci responsables de la quimiotaxis. Només la CypB i amb la participació dels GAGs pot augmentar l'adhesió a la matriu extracel·lular mitjançant les integrines (Allain F. et al., 2002).

Les plaquetes estan implicades en processos inflamatoris i de coagulació. La CypB interacciona amb les plaquetes via receptor CD147 i de manera independent als GAGs. Aquesta interacció promou l'adhesió de les plaquetes al col·lagen via una entrada de calci i la fosforilació de la cadena lleugera de la miosina. La CsA redueix aquesta unió (Allain F. et al., 1999).

Un assaig de doble híbrid en llevat identifica la prolactina com a proteïna d'unió a la CypB. La proliferació de línies cel·lulars depenent de prolactina es veu augmentada després de l'addició exògena de CypB. Aquest efecte va acompanyat per un augment de la retrotranslocació nuclear de la prolactina mitjançant la internalització -per una via similar a la del sistema endosomal- i transport a través de les membranes del reticle endoplasmàtic i nucli. La internalització en la cèl·lula de complexos extracel·lulars de CypB i prolactina es dona via el receptor d'aquesta última i l'entrada a nucli del complex depèn del senyal de translocació nuclear situat a l'extrem N-terminal de la CypB (Rycyzyn M.A. et al., 2000). El complex nuclear CypB-prolactina interacciona amb el factor de transcripció Stat5 augmentant la capacitat del factor d'unir-se al DNA i promovent la transcripció gènica depenent d'aquest. Aquesta unió és depenent de l'activitat PPlasa (Rycyzyn M.A. et al., 2002).

ESTRÉS OXIDATIU

La CypB és secretada per les cèl·lules de la musculatura llisa vascular (VSMC) després de provocar un breu estrés oxidatiu. Com a conseqüència de la secreció es produeix un activació de la via de la senyalització de la ERK1/2, quinasa que promou la supervivència cel·lular. Aquestes dades suggereixen que la CypB podria actuar com a mediador en resposta a les ROS (Liao D.F. et al., 2000).

L'expressió de l'mRNA de CypB en el túbul proximal contort es troba augmentada en rates SHR (*spontaneously hypertensive rats*) (Iwai N. et al., 1990; Kainer D.B. et al., 2000). La depleció de sodi de la dieta també altera l'expressió renal de la CypB. Aquests resultats suggereixen que la CypB podria estar implicada en la retenció renal de sodi (Iwai N. et al., 1990). Posteriorment es demostra per tècniques de doble híbrid en llevat que la CypB interacciona amb el factor d'inici de l'elongació (eIF)-2-β. El complex eIF és el principal regulador de la traducció al ribosoma i juga un paper important en la resposta cel·lular a l'estrés per hipòxia o per depleció d'ATP. Aquestes dades suggereixen que l'augment de la CypB en el ronyó de rates SHR podria reflectir una resposta cel·lular a l'estrès causat augment de proteïnes no plegades al reticle endoplasmàtic, depleció d'ATP i estrés oxidatiu (Kainer D. B. et al., 2000).

TRANSDUCCIÓ DE SENYALS DE CALCI

Com ja s'ha esmentat anteriorment la CsA, inhibeix el senyal de calci provinent del receptor de la cèl·lula T (TCR) (vegeu transducció de senyals de calci de CypA). Per tal d'identificar homòlegs potencials a la CsA que poguessin regular el senyal de calci es procedeix a detectar proteïnes d'unió a la CypB per tècniques de doble híbrid en llevat. Així s'identifica la CAML (*calcium-signal modulating cyclophilin ligand*) que actua *downstream* del TCR i *upstream* de la calcineurina produint una mobilització de calci en el limfòcit T. La CAML apareix com un nou participant en la via transducció de senyals de calci implicant la CypB en aquesta via de senyalització (Bram R.J. et al., 1994).

3.2.3. La ciclofilina D (CypD)

La CypD té un pes molecular de 22 kDa i presenta a l'extrem N-terminal un pèptid que dirigeix la proteïna a la mitocòndria. La CypD s'ha identificat en *Neurospora crassa* (Tropschug M. et al., 1988), en llevat (McLaughlin M.M. et al., 1992), en rata (Andreeva L. et al., 1995) i en humans (Bergsma D.J. et al., 1991).

Mitjançant la tècnica de *Northern blot* es demostra que l'mRNA de CypD és present a múscul, cor, fetge, ronyó i cervell de rata (Woodfield K.Y. et al., 1997).

ACTIVITAT PPIasa I PLEGAMENT PROTEIC

La majoria de proteïnes mitocondrials es sintetitzen al citoplasma de cèl·lula i posteriorment es transporten cap a la mitocòndria. Aquestes proteïnes entren a la mitocòndria a través de canals multiproteïcs, per fer-ho han de desplegar-se i un cop dins tornar-se a plegar correctament. En llevats s'ha demostrat l'existència de xaperones mitocondrials, entre elles la CypD, que ajudarien al correcte replegament d'aquestes proteïnes. L'activitat xaperona, però no l'import de proteïnes a la mitocòndria, és inhibit per CsA (Matouschek A. et al., 1995).

MORT CEL·LULAR I MITOCÒNDRIA

Les mitocòndries són els orgànuls responsables de la síntesi i el subministrament de l'ATP mitjançant la fosforilació oxidativa. Per produir energia oxiden substrats procedents del metabolisme cel·lular (glucòlisi, oxidació d'àcids grassos, cicle de *Krebs*, degradació d'aminoàcids, etcètera). Els electrons del poder reductor resultant, són transportats fins a l'oxigen a través de la cadena respiratòria. Aquest flux d'electrons està acompanyat per una transferència de protons a través de la membrana mitocondrial produint un gradient electroquímico que és aprofitat per l'ATP sintetasa per a generar ATP a partir d'ADP i fosfat (FIGURA 18).

La mort cel·lular es pot donar per dos mecanismes diferents la necrosi i l'apoptosi.

La necrosi és un procés patològic pel qual les cèl·lules moren al ser exposades a un dany físic o químic. L'apoptosi és un procés fisiològic de mort programada que es dona quan hi ha la necessitat d'eliminar cèl·lules en processos fisiològics normals. La mort cel·lular per apoptosi es pot desencadenar per senyals externs o interns.

1. Apoptosi per via extrínseca mitjançada per receptor: després de l'activació dels receptors de mort per unió amb el seu lligand, la proteïna adaptadora FADD produeix la immediata activació de la caspasa iniciadora: la caspasa-8. La caspasa-8 activada promou l'activació de les caspases efectores 3, 6 i 7. Paral·lelament la caspasa-8 pot activar la via apoptòtica mitocondrial activant la proteïna Bid. Aquesta proteïna promou la sortida del citocrom c de la mitocòndria i l'activació de la caspasa-9. Aquesta, igual que la caspasa-8, activarà les caspases efectores. Els receptors de mort cel·lular més freqüents són el FAS i el TNFR1. Són proteïnes transmembrana amb un domini extracel·lular d'unió al receptor FasL i TNF respectivament i un domini citoplasmàtic de mort. Aquest domini també

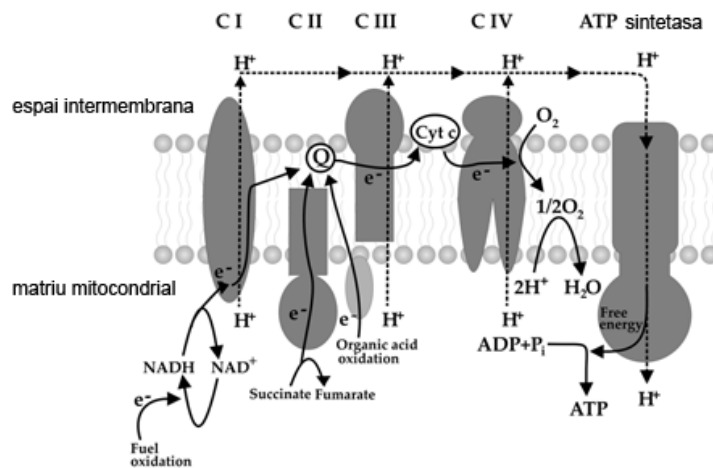


Figura 18. Esquema de la cadena de transport d'electrons i de la síntesi d'ATP. Imatge obtinguda a la pàgina web <http://herkules oulu.fi/isbn9514268490/html/c347.html>.

el presenten les proteïnes adaptadores amb les que connecten. Aquestes molècules adaptadores són les responsables de transmetre el senyal des dels receptors de mort cel·lular (FIGURA 19).

2. Apoptosi per via intrínseca o mitocondrial: l'apoptosi induïda per senyals intrínseques o per estrès comença amb la ruptura de la permeabilitat de la membrana mitocondrial i l'alliberació de molècules proapoptòtiques com el citocrom c -que desencadena l'activació de les caspases mitjançant la formació junt amb Apaf-1 (*apoptotic protease-activating factor 1*) i la procaspasa-9, de l'apoptosoma-, Smac/DIABLO -que bloquegen l'acció de les proteïnes inhibidores de l'apoptosi (IAP) que al seu torn neutralitzen les formes actives de les caspases- i el factor inductor de l'apoptosi (AIF) -que juntament amb l'endonucleasa G participen en la condensació de la cromatina i en la degradació del DNA per una via independent a la de les caspases-. La caspasa-2 també està implicada en la mort cel·lular intrínseca ja que indueix la sortida de proteïnes proapoptòtiques de la mitocòndria. La sortida d'aquestes proteïnes té lloc pel porus de permeabilitat transitòria mitocondrial (PPTM). Les proteïnes proapoptòtiques com Bax i Bad s'activen per interacció directa amb la proteïna Bid. Alternativament la unió d'altres proteïnes proapoptòtiques com Noxa, Puma, Bad i Bim amb les antiapoptòtiques Bcl-2 i Bcl XL origina una inactivació de Bax i Bad evitant el desenllaç fatal per la mitocòndria. L'equilibri entre la supervivència i la mort cel·lular està determinat per les concentracions relatives dels factors proapoptòtics i antiapoptòtics dels membres de la família de Bcl-2. Si finalment la balança es venç a favor de la mort cel·lular, es produeix l'alliberació dels factors proapoptòtics que activaran la caspasa-9 i aquesta activarà les caspases efectores (Martinou J.C. et al., 1998) (FIGURA 19).

Recentment s'ha demostrat que les lesions directes al DNA i l'estrès del reticle endoplasmàtic poden causar la mort cel·lular per apoptosi. Les lesions al DNA augmenten els nivells de la proteïna p53, provocant un increment dels nivells citosòlics de Bax que transloca cap a la mitocòndria causant la formació de porus. L'estrès del reticle endoplasmàtic produeix apoptosi per activació directa de la caspasa-12 responsable de l'activació de la caspasa-9 (Morishima N. et al., 2002).

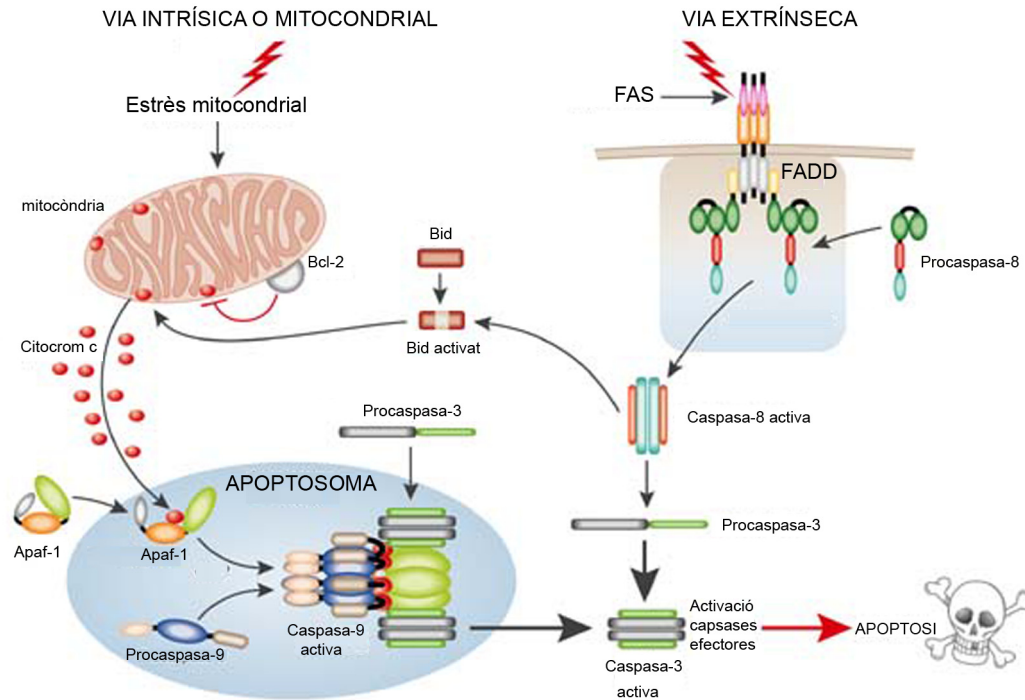


Figura 19. Vies d' inducció de la mort cel·lular per apoptosi. Esquema general de les dues rutes apoptòtiques: l'extrínseca i la intrínseca o mitocondrial. La via extrínseca és donada per activació dels receptors de mort i la via intrínseca s'indueix per estrès mitocondrial.

La CypD resideix a la matriu mitocondrial. Tot i que el seu rol fisiològic no està clar, experiments de *pull-down* confirmen que la CypD s'uneix a la ANT (*adenine nucleotide translocase*) i al complex ANT-VDAC (*voltage-dependent anion channel*) (Crompton M. et al., 1998; Woodfield K. et al., 1998). La proteïna ANT es localitza a la membrana mitocondrial interna i és la responsable del l'intercanvi ADP-ATP essencial pel metabolisme bioenergètic de la mitocondria. Recentment s'ha demostrat que l'intercanvi ADP-ATP necessita que la proteïna ANT es trobi unida a la CypD (Temkin V. et al., 2006). El VDAC és un canal proteic que es localitza a la membrana mitocondrial externa i permet el pas de soluts de baix pes molecular. El complex VDAC-ANT és capaç de reclutar altres proteïnes dependent de la funció mitocondrial a realitzar. Així, s'ha demostrat la unió al complex de l'enzim creatinina fosfoquinasa facilitant la difusió de la creatinina (McEnery M.W. et al., 1992), la unió del receptor de les benzodiazepines a VDAC regulant la transferència del colesterol extramitocondrial fins a la membrana interna de la mitocondria (Papadopoulos V. et al., 1999), etcètera. Aquests complexos doncs s'han convertit en centres multifuncionals que s'agreguen i es disgreguen en funció del procés fisiològic que s'ha de portar a terme. La unió de la CypD amb el complex ANT-VDAC i altres proteïnes com les hexoquinases o els membres de la família Bcl-2 (Marzo I. et al., 1998) formen i el porus de permeabilitat transitòria mitocondrial (PPTM) que està implicat en la mort cel·lular sigui per apoptosi o per necrosi produïda bàsicament per estrès oxidatiu i isquèmia (Crompton M., 1999).

En condicions d'estrès oxidatiu, alts nivells de calci i baixa concentració d'ATP *in vitro*, el complex CypD-ANT-VDAC es converteix en un porus permetent la difusió lliure de molècules de pes molecular inferior a 1.500 Daltons. Aquestes són les condicions que també es donen en un procés d'isquèmia/reperfusió suggerint doncs que l'obertura del porus podria ser un factor important en la

necrosi produïda durant la isquèmia/reperfusió. També existeixen evidències que aquest complex participaria en l'apoptosi. S'ha demostrat que diferents components del complex poden interaccionar amb proteïnes proapoptòtiques com Bax i que l'obertura del porus provoca que les mitocòndries s'inflin per entrada d'aigua i pèrdua del potencial de membrana donant lloc a la ruptura de la membrana mitocondrial interna i la subsegüent alliberació de proteïnes com el citocrom c, Smac/DIABLO, Apaf-1, el factor inductor de l'apoptosi (AIF) i alguns membres de la família de les caspases com la caspasa-2 i la caspasa-9 importants en la progressió de l'apoptosi (Crompton M., 1999; Zamzami N. et al., 2001; Scorrano L. et al., 2002; Tornero D. et al., 2002). La formació del porus és inhibida per la CsA, fet suggereix que la CypD està implicada en la regulació de l'obertura del PPTM (Crompton M. et al., 1988; Broekemeier K.M. et al., 1995). Dos treballs recents en què s'han generat ratolins *knock-out* (KO) i transgènics per la CypD, han revelat que els animals KO per aquesta ciclofilina després de sotmetre'ls a diferents estímuls apoptòtics es comporten de manera similar als animals controls, però mostren resistència a la mort cel·lular per necrosi induïda per una sobrecàrrega de calci o per la presència de ROS. Així mateix, els ratolins deficients per la CypD, resisteixen al dany induït per isquèmia-reperfusió en el teixit cardíac, reduint fins a un 40% l'àrea necrosada comparant amb els ratolins control. Contràriament, els animals transgènics amb sobreexpressió de la CypD presenten hipertrofia cardíaca, reducció de la funció cardíaca i un augment anormal del volum de les mitocòndries (Nakagawa T. et al., 2005; Baines C.P. et al., 2005).

En un altre model d'animals KO per la CypD, s'ha demostrat tant *in vivo* com *in vitro* que aquesta ciclofilina és un component essencial del PPTM. Experiments de mort cel·lular demostren que la CypD no participa en la mort cel·lular per apoptosi induïda per diferents estímuls, però en canvi té un paper fonamental en la mort produïda per l'estrès oxidatiu. També s'ha demostrat que la deficiència de CypD protegeix les neurones de la mort induïda per isquèmia causada per l'oclusió de l'artèria cerebral mitja (Schinzel A.C. et al., 2005).

Existeix molta controvèrsia pel que fa a la participació de la CypD al PPTM i a la mort cel·lular per apoptosi. Varis autors que suggereixen que la CypD no promou l'apoptosi sinó que la reprimeix. Hi ha estudis que demostren que la supressió de l'apoptosi és mitjançada per la seva activitat peptidil-prolil cis/trans isomerasa (Lin D.T., et al., 2002). Estudis recents demostren que la sobreexpressió de la CypD protegeix a les cèl·lules de glioma de la mort cel·lular per apoptosi depenent de la proteïna bax, mentre que mutants per a la CypD promouen l'alliberació del citocrom C de la mitocòndria i la mort cel·lular per apoptosi. Aquests mateixos autors demostren que la inhibició de la CypD amb la CsA sensibilitza a aquestes cèl·lules a l'apoptosi. Per tots aquests motius postulen que la CypD suprimeix l'apoptosi i que es requereix la seva activitat peptidil-prolil cis/trans isomerasa per aconseguir els efectes antiapoptòtics, ja que han observat que l'activitat PPlasa de la CypD estableix la unió de l'hexoquinasa II a la mitocòndria, demostrant que la sobreexpressió de CypD augmenta els nivells de la proteïna hexoquinasa II i en canvi els mutants o la disfunció de la CypD produeix una disminució dels nivells d'aquesta proteïna a la mitocòndria. L'hexoquinasa II, és una proteïna que s'uneix a altres components del PPTM i antagonitza els efectes produïts per la proteïna mitocondrial pro-apoptòtica bax. Per tant, es necessita de l'activitat PPlasa de la CypD per establir l'hexoquinasa II i produir els efectes anti-apoptòtics (Machida K. et al., 2006).

3.2.4. Altres ciclofilines

CypC i Cyp40

La Cyp40 s'uneix directament a l'Hsp90 per formar un heterocomplex amb el receptor de glucocorticoides, aquesta interacció també és interferida per la CsA (Owens-Grillo, J.K. et al., 1995).

La CypC, igual que la CypB, es caracteritza per presentar extrems terminals únics i per la presència d'un pèptid senyal amino-terminal. En un primer estudi de la distribució tissular de la proteïna va indicar certa especificitat d'expressió renal (Friedman J. et al., 1994). Estudis posteriors, en canvi, demostren que la CypC s'expressa igualment i amb la mateixa abundància en altres teixits com múscul esquelètic, pàncrees, cor, pulmó i fetge. (Schneider H. et al., 1994)

3.3. LES FK506 *BINDING* PROTEINS (FKBP)

Les FKBP es localitzen en cèl·lules procariotes i eucariotes. La seva massa molecular oscil·la entre 12 i 63 KDa i el seu punt isoelectric és àcid per la majoria d' FKBP procariotes i bàsic per la majoria d'FKBP eucariotes (Galat A., 1993). Majoritàriament es localitzen al citoplasma de les cèl·lules on representen entre el 0,2-0,4% del total de les proteïnes citosòliques. També es poden trobar a la membrana plasmàtica i al nucli cel·lular (Siekierka J.J. et al., 1989).

Les FKBP posseeixen activitat peptidil-prolil cis/trans isomerasa, el seu substrat però és diferent al de les ciclofilines. Les FKBP s'uneixen a l'FK506 o a la rapamicina. (Galat A., 1993).

3.3.1. FKBP12

És la proteïna d'unió a l'FK506. Va ser aïllada independentment, a finals dels anys 80, de melsa humana, timus de porc (Harding M.W. et al., 1989) i de cèl·lules Jurkat (Siekierka J.J. et al., 1989). Posteriorment es va anar identificant en altres espècies com ratolí (Nelson P.A. et al., 1991), llevat (Heitman J. et al., 1991) i humans (Standaert R. et al., 1990).

La unió de l'FK506 amb la FKBP inhibeix l'activitat fosfatasa de la calcineurina, produint en últim terme la immunosupressió (Shreiber S.L. et al., 1992). Aquest mecanisme és igual a l'explicat pel complex CsA-Ciclofilina (vegeu l'apartat 2.3 de la INTRODUCCIÓ).

3.3.2. FKBP25

Grup de proteïnes d'unió a la rapamicina exclusivament. Aïllada per primera vegada de cervell, melsa i timus boví (Galat A. et al., 1992). Es caracteritzen per tenir un elevat contingut d'aminoàcids carregats positivament.

3.3.3. FKBP52

Aïllada d'una llibreria de cDNA de fetge de ratolí (Lebeau M.C. et al., 1992) i d'una llibreria de cDNA humana (Peattie D.A. et al., 1992). La funció principal d'aquest grup de proteïnes és la de xaperona tot i tenir un domini d'unió a l'FK506, a la calmodulina i a l'ATP (Galat A., 1993).

4. LES CICLOFILINES I EL DANY RENAL

Tot i que els mecanismes moleculars pels quals la CsA produeix la immunosupressió són ben coneguts, es desconeixen els responsables de la toxicitat renal. En un estudi realitzat per Sigal i col. utilitzant diferents anàlegs de CsA, demostren que la toxicitat renal causada per la CsA està correlacionada amb l'activitat immunosupressora de la mateixa. Contràriament la inhibició de l'activitat PPIasa de les ciclofilines per la CsA i els diferents anàlegs no està relacionada amb la capacitat immunosupressora del fàrmac. Aquests experiments suggereixen que els mecanismes implicats en la immunosupressió de les cèl·lules T són els mateixos que es produeixen en les cèl·lules implicades en la toxicitat renal (Sigal N.H. et al., 1991, Su Q. et al., 1995). Hi ha altres autors que descriuen que és l'activitat PPIasa de les ciclofilines la responsable de la toxicitat renal. A continuació es descriu quina és la participació de cada una de les ciclofilines en el dany renal causat per la CsA. Tot i això encara calen estudis per aclarir definitivament quines són les proteïnes i/o mecanismes moleculars implicats en la nefrotoxicitat causada pel fàrmac immunosupressor CsA.

4.1. CypA I EL DANY RENAL INDUÏT PER LA CSA

Tal i com s'ha explicat anteriorment, es detecten alts nivells de CypA en ronyó majoritàriament localitzada en les cèl·lules tubulars epitelials (Marks W.H. et al., 1991; Ryffel B. et al., 1991). Experiments de localització subcel·lular en còrtex de ronyó de rata per tècniques de *Western blot* demostren que la CypA es detecta majoritàriament a la fracció soluble i associada a les membranes amb rivet de raspall, i en menys quantitat a la mitocòndria, als microsomes i al nucli. En condicions fisiològiques la CypA es distribueix equitativament entre la fracció soluble i l'associada a les membranes amb rivet de raspall. El tractament amb CsA o la incubació amb un substrat de la ciclofilina redistribueix el contingut de CypA essent més elevat a la fracció soluble. Aquest fet explicaria que la redistribució de la CypA durant el tractament amb CsA podria ser degut a una acumulació a la fracció soluble de proteïnes mal plegades causat per la inhibició de l'activitat PPIasa induïda per la CsA. Tot i que els mecanismes implicats en l'associació de la CypA a les membranes amb rivet de raspall es desconeixen s'especula que també podrien actuar com a molècules xaperones (Demeule M. et al., 2000).

Estudis amb ratolins transgènics que sobreexpressen la CypA i ratolins transgènics mutants per l'activitat PPIasa (mutació de l'arginina en posició 55 per una alanina, R55A) demostren que l'activitat PPIasa és la responsable de la toxicitat renal causada per la CsA. Els ratolins que manifesten la mutació quan es tracten amb CsA presenten una toxicitat renal exacerbada respecte els ratolins control mentre que els ratolins que sobreexpressen la CypA la nefrotoxicitat disminueix (Hong F. et al., 2004) (FIGURA 21). Anteriorment aquest mateix grup demostra que el tractament amb dosis baixes de CsA induïx l'expressió endògena de CypA per acció d'un estrès oxidatiu suau i que la CypA sobreexpressada conferiria resistència al tractament amb dosis elevades CsA en mioblast cardíacs en cultiu (Hong F. et al., 2002). L'augment de l'expressió de CypA també s'ha demostrat en

cèl·lules mare mesenquimàtiques (Silva W.A. et al., 2003), en cèl·lules HeLa sotmeses a radiació U.V. (Decker E.D. et al., 2003) i en plaquetes activades amb trombina (Coppinger J.A. et al., 2004). Per tot això es suggereix que la sobreexpressió de CypA podria ser beneficiosa per a mantenir la integritat i evitar la toxicitat en l'òrgan.

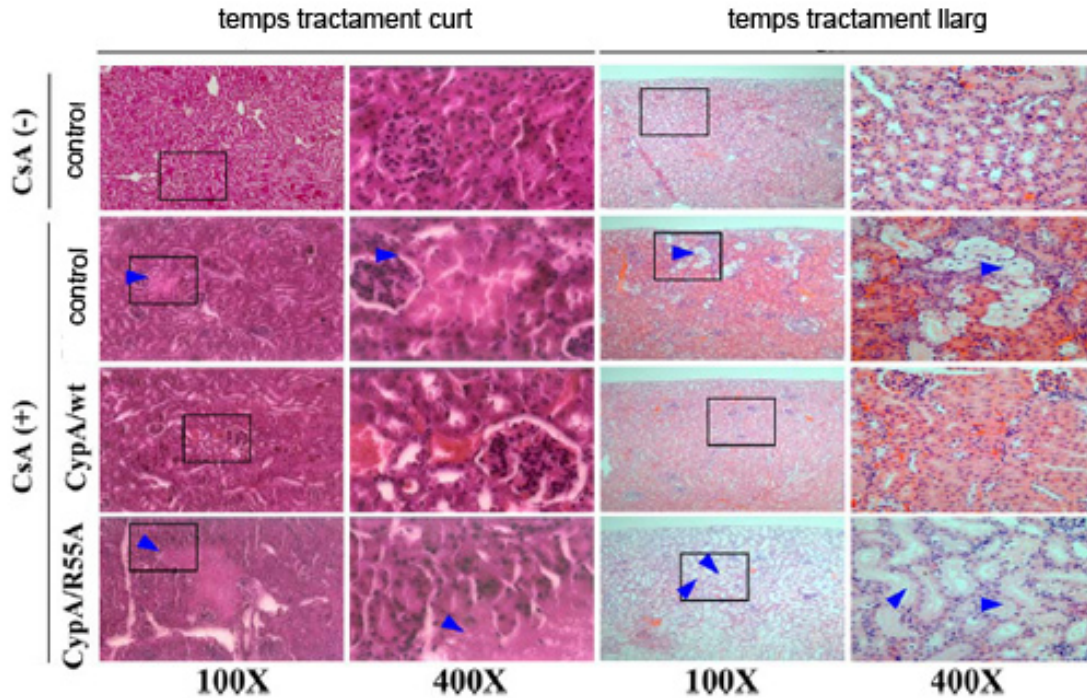


Figura 20. Manifestacions histològiques en ronyons després de l'administració de CsA. Després de fixar els ronyons amb formaldehid i tenyir-los amb HE s'obtenen talls per a examinar histològiques. Aquestes làmines mostren l'efecte de l'activitat PPIasa sobre la nefrotoxicitat causada per la CsA. Les fotografies es realitzen a 100X, els rdetalls enquadrats a 400X. Les fletxe indiquen els canvis patològics (Extret i modificat de Hong F. et al., 2004).

La CsA independentment de causar nefrotoxicitat renal també produeix acidosi tubular renal distal (dRTA). Aquesta malaltia es caracteritza per la no excreció d'àcids a l'orina per part dels túbuls col·lectors causant una acidificació de la sang. Recentment s'ha demostrat que l'absorció de bicarbonat als túbuls col·lectors corticals en presència de CsA es redueix un 30%. Aquesta reducció de l'absorció és causada per la inhibició de l'activitat PPIasa (Watanabe S. et al., 2005).

4.2. CypB I EL DANY RENAL INDUÏT PER LA CSA

En el nostre laboratori mitjançant la tècnica de doble híbrid en llevat s'ha determinat que la CypB interacciona amb la *Kidney androgen-regulated protein* (KAP) (Cebrián C. et al., 2001). El gen que codifica per la KAP és, a nivell d'expressió, el més abundant i específic de túbul proximal renal de ratolí a on pateix una estricta regulació multihormonal per hormones esteroidees i tiroidees en els diferents segments S1/S2 i S3 (Meseguer A. et al., 1987, 1989, 1990 i 1992; Solé E. et al., 1994 i 1996). La seqüència deduïda de la proteïna no presenta homologia nucleotídica, funcional o estructural

amb altres proteïnes dipositades en els bancs de dades. La producció d'anticossos contra aquesta proteïna ha permès observar que la seva distribució i regulació és paral·lela a la del mRNA, indicant que la proteïna també és específica i exclusiva del túbul proximal renal. Degut a la interacció de KAP amb el receptor de la CsA, CypB, suggereix una nova via molecular de toxicitat renal en aquestes cèl·lules. Experiments *in vivo* demostren que ronyons de ratolins tractats amb CsA presenten una disminució significativa de la KAP. En assajos de GST *pull-down* es demostra que la CsA no altera la interacció CypB-KAP tant si aquesta s'afegeix quan ja s'ha donat la interacció com si es preincuba la CypB amb la CsA abans de l'assaig d'interacció. Finalment la sobreexpressió controlada de KAP, mitjançant transfecció estable i controlada per tetraciclina, en el sistema cel·lular derivat de túbul proximal de ratolí demostren que l'expressió de la KAP disminueix la toxicitat induïda per la CsA en aquestes cèl·lules (Cebrián C. et al., 2001) (FIGURA 22).

Per tant és molt important identificar l'homòleg funcional de KAP en ronyó humà i elucidar quins són els processos moleculars i cel·lulars de toxicitat renal induïda per la CsA en què intervenen KAP i els receptors de la CsA.

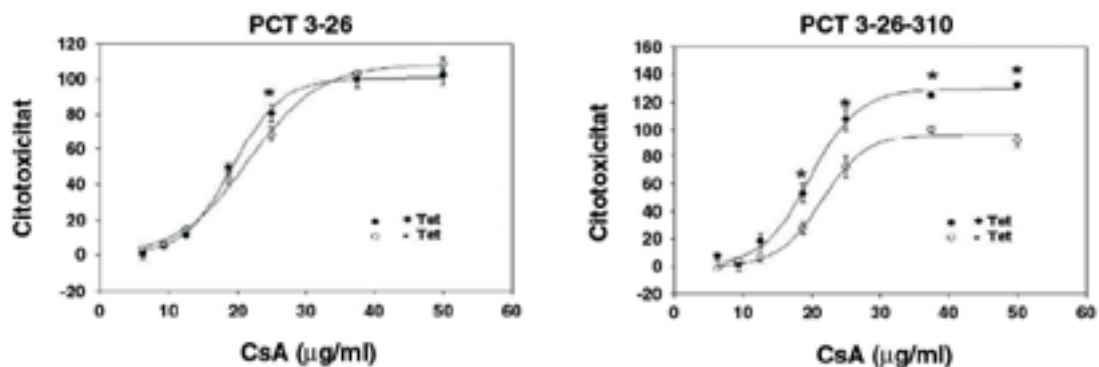


Figura 21. L'expressió de la proteïna KAP protegeix de la toxicitat induïda per la CsA. Cèl·lules de túbul proximal renal (PCT) es sotmeten a dosis creixents de CsA durant 24 h i determinant-se la toxicitat induïda pel fàrmac mesurant l'activitat lactat deshidrogenasa (LDH) en cultiu. El clon PCT 3-26 s'utilitza com a control de l'efecte de la tetraciclina (Tet). El clon 3-26-310 sobreexpressa la proteïna KAP en absència de Tet en el medi (sistema Tet-Off™ de transfecció estable i regulada). *, $p < 0.001$. (Extret i modificat de Cebrián, C. et al., 2001).

4.3. CYPD I EL DANY RENAL INDUÏT PER LA CSA

Tot i que s'ha descrit àmpliament la importància de la CypD en el dany induït per la isquèmia i reperfusió en cor i cervell, no existeixen publicacions on es determini la importància d'aquesta proteïna en el ronyó sotmès al dany. Treballs recents descriuen diferències qualitatives i quantitatives en l'activitat i els components de les mitocondries dels diferents teixits. S'ha descrit també una heterogeneïtat tissular en el proteoma mitocondrial (Johnson D.T et al., 2007) i que la fosforilació oxidativa varia en funció del teixit, ja que depen de la quantitat i activitat intrínscica dels diferents components de la cadena respiratòria (Benard G. et al., 2006). Recentment s'ha identificat en mitocondria una nova proteïna proapoptotica (Apop-1) a través de la qual s'allibera el citocrom C de

forma dependent a la CypD. L'apoptosi induïda per Apop-1 és inhibida per la CsA o per la deficiència de la CypD. Aquesta proteïna presenta 2 isoformes i nivells d'expressió diferents en funció del teixit (Yasuda O. et al., 2006). Per tots aquests motius i perquè a diferència del cor i del cervell, el ronyó pot recuperar-se del dany causat per la isquèmia o la toxicitat a través de processos regeneratius que de forma fisiològica tenen lloc a les cèl·lules epitelials de túbul renal el nostre grup està treballant per entendre quin és el paper de la CypD en el dany produït per isquèmia i reperfusió en cèl·lules humanes del túbul proximal renal.