

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



OBJECTIUS

El mecanisme pel qual la CsA produeix el seu efecte immunosupressor sobre el limfòcit T és ben conegut. 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, impeding 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 (IL-2), produint així la immunosupressió (Handschumacher R.E. et al., 1984, Shreiber S.L. et al., 1992).

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 en destaca la toxicitat renal.

Per tant, mentre els mecanismes moleculars implicats en la immunosupressió són ben coneguts, es desconeixen quins són els mecanismes moleculars responsables de la nefrotoxicitat causada per la CsA. Hi ha autors que postulen que la toxicitat renal està correlacionada amb l'activitat immunosupressora de la mateixa. Aquesta idea es deu a que l'FK506 produeix els mateixos efectes tòxics al ronyó que la CsA i el mecanisme d'immunosupressió dels LT es dona també via la inhibició de la calcineurina (Sigal N.H. et al., 1995). Hi ha altres autors, en canvi, que defensen que és l'activitat PPIasa de les ciclofilines la responsable de la toxicitat renal induïda per la CsA. Ratolins amb l'activitat PPIasa mutada presenten una toxicitat renal exacerbada mentre que ratolins que sobreexpressen la CypA la nefrotoxicitat disminueix (Hong F. et al., 2004).

Estudis en el nostre laboratori determinen que la proteïna *Kidney-Androgen-regulated protein* (KAP) de funció desconeguda i expressada específicament en les cèl·lules del túbul proximal renal interacciona amb el receptor de la CsA, la ciclofilina B (CypB) (Cebrián C. et al., 2001). Els nivells de la proteïna KAP disminueixen notablement en ronyons de ratolins tractats amb la CsA i la seva expressió controlada en un sistema cel·lular de túbul proximal renal redueix significativament la toxicitat induïda pel fàrmac immunosupressor CsA. Aquests resultats suggereixen nous mecanismes moleculars de toxicitat.

Així, amb el treball descrit en aquesta tesi, s'inicia un projecte adreçat a determinar els processos implicats en la toxicitat renal causada per la CsA en el túbul proximal renal, així com estudiar la participació de les ciclofilines en aquesta nefrotoxicitat.

A tal efecte, es plantegen els següents objectius concrets:

1. Analitzar l'efecte causat per la CsA en diferents models cel·lulars.

1.1. Estudi de la viabilitat i toxicitat cel·lular.

1.2. Estudi de la mort cel·lular.

2. Estudi proteòmic dels models cel·lulars anteriorment descrits:

2.1. Analitzar i estudiar els mapes proteics procedents de les cèl·lules PCT3 i HK-2 a fi de identificar marcadors moleculars i/o proteïnes implicades en la toxicitat renal causada per la CsA.

2.2. Confirmar les diferències d'expressió trobades en l'anàlisi proteòmic mitjançant tècniques alternatives.

3. Eliminació de l'expressió gènica de les ciclofilines A i B, mitjançant RNAi, en el model cel·lular PCT3:

3.1. Estudiar la toxicitat causada per la CsA en absència dels seus receptors.

3.2. Estudi proteòmic i identificació de proteïnes afectades per l'eliminació de l'expressió gènica de les ciclofilines.