

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



DISCUSSIÓ

Les ciclofilines són una família de receptors intracel·lulars, ubiquament expressats, capaços d'unir immunosupressors no relacionats tals com la CsA i l'FK506. La CsA, polipèptid cíclic d'origen fúngic, s'uneix a les ciclofilines, mentres que, l'FK506 s'uneix a altres proteïnes receptores anomenades *FK binding proteins* (FKBP). Tant les ciclofilines com les FKBP's posseeixen activitat peptidil-prolil cis/trans isomerasa que és inhibida pels seus respectius lligands (Galat A., 1993).

La CsA unida als seus receptors, exerceix el seu efecte immunosupressor sobre els limfòcits T a través de la calcineurina, que al seu torn inhibeix la fosforilació i translocació al nucli de l'NFAT impedit així la transcripció de gens implicats en la immunosupressió (Shreiber S.L. et al., 1991).

Tot i l'espectacular benefici que ha suposat l'ús d'aquests fàrmacs en la reducció del rebuig i en l'augment de la vida mitja dels trasplantaments, així com l'ús de la CsA en malalties autoimmunes, s'ha vist limitat pels efectes tòxics que es produeixen de manera majoritària al ronyó (Bennett W.M. et al., 1983). Tot i que els mecanismes d'acció de la CsA sobre el sistema immunitari ha estat ben caracteritzats, es coneix molt poc sobre els mecanismes teixit i cel·lular específics implicats en el dany renal produït per la CsA.

El nostre laboratori ha estat interessat tradicionalment en estudiar els mecanismes d'acció androgènica en el ronyó, teixit que especialment en ratolí, presenta una marcada inducció gènica en resposta als andrògens. Entre aquests gens sotmesos a aquesta regulació hormonal i amb una expressió pràcticament exclusiva del túbul renal hi trobem la *Kidney Androgen-regulated Protein* (KAP). L'estudi d'aquesta proteïna ha centrat gran part de la feina realitzada al nostre laboratori els últims anys (Solé E. et al., 1994; Solé E. et al 1996; Cebrián C. et al., 2001; Soler M. et al., 2002 i Teixidó N., 2006). Estudis de dos híbrids en llevat demostren que la proteïna KAP interacciona amb la CypB, receptor del fàrmac immunosupressor CsA. La proteïna KAP disminueix notablement en ratolins tractats amb CsA i la seva expressió controlada en un sistema cel·lular de túbul proximal renal, les cèl·lules PCT3, redueix de forma significativa la toxicitat produïda per la CsA (Cebrián C. et al., 2001).

Per tots aquests motius, s'enceta un nou projecte basat en la determinació i estudi dels mecanismes moleculars implicats en la toxicitat renal produïda per la CsA en el túbul proximal renal.

Els resultats obtinguts al llarg d'aquest treball experimental, han permès aportar les primeres dades sobre el comportament de les cèl·lules tubulars renals davant el tractament amb la CsA i identificar alguns dels mecanismes moleculars implicats en la toxicitat renal causada per aquest fàrmac immunosupressor. Aquests resultats obtinguts han obert les portes a l'exploració de les noves rutes i/o proteïnes implicades en la nefrotoxicitat objectiu d'estudi actual al nostre laboratori.

1. CARACTERITZACIÓ DELS SISTEMES CEL·LULARS TUBULARS RENALS

És ben conegut que la CsA és un potent immunosupressor àmpliament utilitzat en el trasplantaments d'òrgans sòlids i que com a principal efecte secundari mostra una elevada toxicitat renal que pot conduir a la pèrdua de la funció renal (Borel J.B. et al. 1996). Mentre els mecanismes pels quals la CsA produeix la immunosupressió són ben coneguts es desconeixen quins són els mecanismes d'acció a nivell molecular implicats en aquest dany renal.

Tal i com s'ha explicat anteriorment la toxicitat renal causada per la CsA es pot manifestar de forma aguda, normalment reversible, i de forma crònica que és la que finalment donarà lloc a la pèrdua total de la funció renal (Vegeu l'apartat 2.4 de la INTRODUCCIÓ). La patogènesi de la toxicitat renal causada per la CsA ha estat àmpliament estudiada tant *in vitro* com *in vivo*. Aquests estudis demostren que la nefrotoxicitat induïda per la CsA implica un complex procés multifactorial en el qual hi estan implicats el glomèrul, l'epiteli tubular i intersticial i el sistema vascular, donant lloc majoritàriament a fibrosi intersticial, atròfia tubular i hialinosi arteriolar (Mihatsch M.J. et al., 1998; Thomas S.E. et al., 1998; Shihab F., 1999, i Cattaneo D. et al., 2004).

Per tal de conèixer i caracteritzar els sistemes cel·lulars amb els que estem treballant, s'ha estudiat el comportament de diferents línies cel·lulars derivades de túbul proximal renal sigui d'origen humà (HK-2) com de ratolí (PCT3 i PR10), davant del tractament amb el fàrmac immunosupressor ciclosporina A.

1.1. Efecte dels diferents fàrmacs, dosis i temps de tractament en la viabilitat cel·lular

És a l'inici d'aquest treball experimental, quan comencem a estudiar la toxicitat renal induïda per la CsA en cèl·lules tubulars renals, que ens n'adonem que existeix una elevada controvèrsia pel que fa al tipus de ciclosporina A a utilitzar. Així, hi ha autors que utilitzen la Ciclosporina SANDIMMUN® (NOVARTIS) (Bakker R.C. et al., 2002 i Carvalho da Costa M. et al., 2003) i d'altres que utilitzen la CsA (CALBIOCHEM®) (Healy E. et al., 1998; Lally C. et al., 1999; Justo P. et al., 2003 i Jennings P. et al., 2007). Tampoc hi ha consens alhora d'establir quines són les dosis de fàrmac causants de la toxicitat cel·lular.

Per tots aquests motius, en primer lloc, es realitza un assaig de toxicitat cel·lular utilitzant diferents línies cel·lulars, varis compostos i un rang ampli de concentracions (eugeu apartat 1.1.1 dels RESULTATS). Amb aquests experiments es demostra que tant a les cèl·lules PCT3 com a les cèl·lules HK-2, la ciclosporina SANDIMMUN® (NOVARTIS) provoca una toxicitat cel·lular més exacerbada que la CsA (CALBIOCHEM®) a les dosis més elevades. En aquestes mateixes condicions també s'observa una pronunciada toxicitat del vehicle. L'elevada citotoxicitat de la ciclosporina SANDIMMUN® (NOVARTIS) podria ser deguda en gran part al vehicle ja que no només és tòxic per si sol sinó que acomplexat amb la ciclosporina fa que sigui més hidrosoluble i per tant, pugui difondre millor a l'interior de les cèl·lules. La toxicitat causada pel Cremophor®EL seria dosi dependent, ja que dosis baixes d'aquest component no alteren la viabilitat cel·lular.

La toxicitat cel·lular causada pel SANDIMMUN® (NOVARTIS) i el Cremophor®EL a dosis elevades també es descriu en cultius primaris de cèl·lules epitelials humanes de túbul proximal renal (PTEC) (Bakker R.C. et al., 2002). Així mateix, la toxicitat causada pel Cremophor (vulgarment anomenat oli de rici) està àmpliament estudiada en rata, tant *in vitro* com *in vivo*, i s'ha observat que les dosis elevades i els llargs temps d'incubació d'aquest compost, són els causants de la toxicitat cel·lular (Jiang T. et al., 1993). Aquesta toxicitat provoca disfunció tubular, alteració de l'hemodinàmia renal i contribueix en els efectes adversos després del trasplantament (Besarab A. et al., 1987), la qual és responsable de la disminució de l'ATP i de la fosforilació oxidativa a les mitocondries, donant lloc finalment als efectes adversos post-trasplantament (Nassberger L., 1990). Estudis recents, suggereixen una disminució de la toxicitat renal induïda per la ciclosporina SANDIMMUN® (NOVARTIS) quan es substitueix el Cremophor®EL per un polímer que forma micel·les (Aliabadi H.M. et al., 2007).

Tot i que ha estat interessant veure com els diferents compostos assajats provoquen toxicitats cel·lulars de diferent intensitat, en els estudis posteriors només s'analitzaran els efectes causats pel fàrmac immunosupressor, CsA (CALBIOCHEM®), en la seva forma no acomplexada.

L'ampli estudi de la toxicitat cel·lular produïda per la CsA fa palesa l'existència d'una dosi líndar de CsA equivalent a la concentració de 10 µM. A partir d'aquesta concentració, la viabilitat cel·lular comença a decaure de forma significativa després de 24 hores de tractament. Existeixen varis experiments que demostren que la dosi de CsA a partir de la qual comença a decaure la viabilitat cel·lular és molt variable en funció de la línia cel·lular utilitzada. Així mateix, en cèl·lules del túbul proximal porcines (LLC-PK₁) la disminució de la viabilitat es manifesta a la dosi de 42 µM de CsA (Healy E. et al., 1998) i en cultius primaris humans de túbul proximal (PTEC) la viabilitat comença a disminuir a la concentració de 83 µM (Bakker R.C. et al., 2002).

Pel que fa a les cèl·lules HK-2 existeix un experiment recent on també es demostra que la disminució de la viabilitat cel·lular ocorre a la concentració de 10 µM de CsA ja que a partir d'aquesta dosi comença a incrementar l'activitat LDH al sobrenedant d'aquestes cèl·lules (Jennings P. et al., 2007). La mesura de l'activitat LDH és un mètode més per quantificar la toxicitat cel·lular, ja que LDH és un enzim citoplasmàtic que només s'allibera al medi de cultiu quan les cèl·lules tenen la membrana plasmàtica malmesa. Sarró et al, demostren com la dosi de 10 µg/ml (8,3 µM) provoca citotoxicitat en cèl·lules PCT3 després de 12-24h de tractament, calculada com una disminució del nombre de cèl·lules que són capaces d'excloure el Blau Tripà (Sarró E. et al., 2007). Aquests dos treballs reforcen els resultats obtinguts en aquest treball experimental.

Dins l'estudi de la toxicitat cel·lular, també s'ha demostrat, que les cèl·lules tubulars renals PCT3 i HK-2 després de 2- 4h d'haver iniciat el tractament amb la CsA es recuperen del dany inicial causat pel fàrmac sigui quina sigui la dosi utilitzada (FIGURES 30 i 31). Ara bé, quan es els tractaments són més prolongats en el temps (24, 48 i 72h) les concentracions de CsA iguals o superiors a 10 µM disminueixen la viabilitat cel·lular de forma significativa.

Està ampliament reportat que el fàrmac immunosupressor CsA provoca majoritàriament toxicitat renal i que aquesta, té lloc preferentment a la regió tubular de la nefrona (Healy E et al., 1998). En el nostre treball s'ha demostrat que la disminució de la viabilitat només té lloc en les cèl·lules renals d'origen tubular PCT3, PR10 i HK-2 i no a cèl·lules d'origen no renal HeLa. Aquesta citotoxicitat es pràcticament idèntica en les tres línies renals. Hi ha autors, però, que defensen que els canvis histopatològics induïts per la CsA, són causats per múltiples alteracions que tenen lloc en diferents tipus cel·lulars en el ronyó i que depenen de la llargada del tractament i de la dosi utilitzada. Així mateix, la CsA disminueix el creixement cel·lular de cèl·lules epitelials tubulars (HK-2), de cèl·lules endotelials (HEC) i de cèl·lules mesengials però no dels fibroblasts (Esposito C. et al., 2000; Sun J. et al., 1997). Aquesta diferència en el creixement cel·lular explicaria la marcada reducció i atròfia de l'epiteli tubular i l'expansió intersticial que té lloc en els animals tractats amb CsA (Shihab F.S. et al., 1996).

De tots aquests experiments es dedueix que la toxicitat cel·lular causada per la CsA varia en funció de la línia cel·lular, del tipus de ciclosporina, el temps de tractament i el dosatge utilitzats.

1.2. Estudi de la mort cel·lular

El dany cel·lular pot desencadenar una gran varietat de respostes que van desde l'adaptació, la reparació i la proliferació fins la mort cel·lular sigui per apoptosi o per necrosi. L'apoptosi és una forma de mort cel·lular controlada genèticament que té lloc en processos fisiològics normals i en processos patològics ja siguin de malaltia o de dany causat per tòxics.

L'apoptosi és un mecanisme patogènic destacat en les malalties renals. També s'ha demostrat que aquest procés de mort cel·lular programada té lloc tant durant el desenvolupament renal com després d'un dany renal. Concretament, les cèl·lules epitelials tubulars renals, són les que més moren per apoptosi després d'una isquèmia o d'un procés de toxicitat renal (Lieberthal W. et al., 1996 i Hagar H. et al., 1996). Tot i que el procés d'apoptosi pot resultar beneficiós en molts casos, algunes vegades pot ser altament danyós .

Hi ha varis estudis que demostren que la disminució de la viabilitat cel·lular causada pel fàrmac immunosupressor CsA es correspon amb un augment de la mort cel·lular sigui per apoptosi o per necrosi. Així, en cèl·lules LLC-PK1, dosis baixes de CsA (4,2 nM) induïxen una mort cel·lular per apoptosi elevant els nivells d'expressió de Fas, mentre que elevades dosis de CsA (a partir de 21 μ M) provoquen necrosi cel·lular (Healy E. et al., 1998). En cèl·lules epitelials de túbul proximal de ratolí (MCT) la concentració de CsA de 8,3 mM induïx apoptosi augmentant els nivells d'expressió de Fas, produïnt l'alliberació de factors pro-apoptòtics com citocrom C i smac/diablo i alterant el potencial transmembrana mitocondrial (Ortiz A. et al., 1998; Justo P. et al., 2003). En cèl·lules HK-2 l'apoptosi cel·lular es dona a la dosi de CsA de 800 ng/ml (6,6 μ M) (Esposito C. et al., 2000). També existeixen estudis *in vivo* que demostren que el tractament amb CsA provoca un augment significatiu de cèl·lules apoptòtiques majoritàriament en els túbuls i a l'interstici renal que són les zones estructuralment més afectades pel fàrmac immunosupressor. Es coneix també que, el nombre de cèl·lules apoptòtiques correlaciona amb el grau de fibrosi i atròfia tubular renal. Concretament, el tractament amb CsA està associat amb un augment de l'activitat de l'angiotensina II, p53, bax, Fas-L, del sis-

tema de les capsases i amb una disminució de l'activitat de bcl-2 i de l'òxid nítric (NO), suggerint que l'apoptosi juga un rol important en la patogènesi de la nefrotoxicitat crònica induïda per la CsA (Thomas S.E. et al., 1998 i Shihab F.S. et al., 1999).

Els experiments realitzats en aquest treball han permès observar que quan s'usa un medi de cultiu lliure de sèrum fetal i factors de creixement l'apoptosi apareix a les dosis de 100 i 1000 nM de CsA, mentre que si s'utilitza el medi de cultiu complet, que és el que s'ha utilitzat en la resta d'experiments i en la majoria de casos descrits a la literatura, l'apoptosi en les cèl·lules PCT3 i HK-2 es manifesta a les concentracions de 10 i 20 μ M de CsA. Tot i que en ambdues línies cel·lulars l'apoptosi es dona a les mateixes dosis de CsA, en les cèl·lules PCT3 els valors d'apoptosi són més elevats en les cèl·lules HK-2 (FIGURA 8). D'aquests experiments també es conclou que la presència de factors de creixement i sèrum fetal, retarden l'aparició de l'apoptosi. És per aquest motiu que quan es realitza l'experiment de TUNEL utilitzant el medi de cultiu complet no s'observa apoptosi a les dosis de 100 i 1000 nM de CsA.

Cal recordar que l'apoptosi comença a manifestar-se a les cèl·lules tubulars renals a la dosi on s'inicia la davallada de la viabilitat cel·lular de forma significativa.

Novament existeix molta controvèrsia per determinar quina és la dosi de CsA que indueix l'apoptosi cel·lular. De totes aquestes dades s'observa que aquest procés és línia cel·lular dependent.

1.2. Estudi de la respiració mitocondrial

La CsA també disminueix significativament el consum d'oxigen de les cèl·lules HK-2 després de 24 h de tractament.

Un estudi recent *in vivo* demostra que la disminució del consum d'oxigen depèn de la concentració de CsA en sang. Així, elevades concentracions del fàrmac alterarien la membrana mitocondrial interna i conseqüentment els complexos enzimàtics que s'hi localitzen, concretament els complexos I i II de la cadena respiratòria mitocondrial (Rodríguez L.C. 2007). Per tal de corroborar aquesta hipòtesi en les nostres cèl·lules, caldria determinar l'activitat enzimàtica d'alguns dels complexos de la cadena de transport d'electrons per tal d'esbrinar exactament a quin nivell es produeix aquesta disminució del consum d'oxigen.

Ara bé, aquesta disminució del consum d'oxigen es podria donar per una altra causa, ja que recentment, s'ha descrit la importància de la interacció entre CypD i ANT perquè aquesta última funciona com a translocador de nucleòtids. Si es trenca la interacció ANT-CypD s'inhibeix l'intercanvi ADP/ATP, disminuint el contingut d'ATP responsable de la mort cel·lular (Temkin V. et al., 2006). Aquests resultats ens permeten hipotetitzar que el tractament amb CsA impediria la interacció de la CypD-ANT inhibint així l'entrada d'ADP i alentint la cadena de transport d'electrons per falta de substrat.

La CypD és la ciclofilina localitzada exclusivament a la mitocòndria. Existeix molta controvèrsia pel que fa al rol de la CypD en la mort cel·lular per apoptosi. Així, hi ha experiments que demostren que ratolins *K.O.* i transgènics per aquesta ciclofilina són més sensibles a l'apoptosi (Nakagawa T. et al., 2005, Baines C.P. et al., 2005) mentre que d'altres demostren l'activitat PPIasa de la CypD és fonamental per reprimir l'apoptosi (Machida K. et al., 2006). Com que la CypD forma part del PPTM,

existeixen estudis que defensen que l'apoptosi s'indueix per la formació del PPTM (Crompton M., 1999), mentre que d'altres demostren que l'obertura del porus no és l'únic desencadenant de la mort cel·lular per apoptosi sinó que els components del PPTM poden estar implicats per si sols en aquest procés de mort cel·lular programada com a repressors o inductors d'aquesta. Així la proteïna VDAC, un dels primers components del porus identificat, és diana de la proteïna pro-apoptòtica bax, responsable de l'alliberació del citocrom C (Scorrano L. et al., 2002). L'Hexoquinasa II és una proteïna que antagonitza la translocació mitocondrial de la proteïna bax inhibint la interacció entre bax i VDAC en presència de CypD activa (Pastorino J.G. et al., 2002, Machida K. et al., 2006).

Els resultats obtinguts en aquest treball experimental conjuntament amb els reportats a la literatura, proporcionen més èmfasi a la participació de la CypD com a proteïna repressora de l'apoptosi, ja que el tractament amb CsA inhibiria l'activitat peptidil-prolil cis/trans isomerasa impeding així el correcte plegament i estabilització d'algunes proteïnes responsables de desencadenar l'apoptosi. Seria un mecanisme apoptòtic que alliberaria el citocrom C de manera independent a la formació del PPTM.

1.2. Estudi del cicle cel·lular

Un altre paràmetre afectat al sotmetre les cèl·lules PCT3 i HK-2 al tractament amb CsA és el cicle cel·lular. Així, el tractament cel·lular amb la dosi de 10 μ M de CsA produeix una disminució del percentatge de cèl·lules en fase S. Aquesta disminució coincideix amb un augment del percentatge de cèl·lules en fase G0/G1 per la línia cel·lular HK-2 i amb un augment de cèl·lules en fase G2/M per les cèl·lules PCT3. També s'observa com les cèl·lules que s'aturen a la fase G0/G1, les HK-2, són menys susceptibles a morir per apoptosi que les cèl·lules que progressen a través de la fase G1 i s'aturen al següent punt de control del cicle cel·lular com és el cas de les cèl·lules PCT3 (FIGURA 5 i 8).

Recentment, Jennings P. et al., també demostren com el tractament amb CsA (10 μ M) augmenta el percentatge de cèl·lules HK-2 a la fase G0/G1 causat per un augment de la fosforilació de la proteïna p53 que al seu torn activa la transcripció de p21, inhibidor del cicle cel·lular. També observen com la CsA induïx la producció d' H_2O_2 responsable del trencament del DNA i de l'escurçament dels telòmers causant senescència cel·lular. Amb aquests resultats postulen que la CsA causa estrès a les cèl·lules tubulars renals i contribueix a la senescència i envelliment cel·lular. Altres estudis demostren que en cèl·lules LLC-PK₁ les dosis baixes de CsA (4,2 nM) induïxen una parada cel·lular a la fase G1 mentre que a dosis elevades (de 21 a 42 μ M) les cèl·lules s'aturen majoritàriament a la fase G2/M (Lally C. et al., 1999). Aquests mateixos autors postulen que l'arrest en els diferents punts de control del cicle cel·lular podria estar mitjançat per la proteïna p53.

El conjunt d'aquestes dades permet explicar com, les cèl·lules PCT3 i HK-2 tot i presentar valors de toxicitat cel·lular molt similars presenten valors d'apoptosi bastant diferents. D'aquesta manera, mentre una part de les cèl·lules HK-2 progressen pel cicle cel·lular i moren per apoptosi, la resta s'aturen a la fase G0/G1, etapa que es caracteritza per una reducció de l'activitat cel·lular general sense induir apoptosi. Les cèl·lules PCT3 en canvi, superen el primer punt de control i progressen

a través del cicle cel·lular on gran quantitat de cèl·lules moriran degut al dany induït per la CsA. Per tant, en ambdós tipus cel·lulars observem una davallada de l'activitat metabòlica mitocondrial que en el cas de les cèl·lules PCT3 és deguda a la mort cel·lular per apoptosi i en el cas de les cèl·lules HK-2 és provocada en gran part per l'entrada en una etapa de senscència cel·lular.

En resum, aquesta primera part d'aquest treball experimental, ens ha permès determinar que la CsA produeix una davallada de la viabilitat cel·lular de forma significativa a partir de la dosi de 10 μM després de 24h de tractament en els sistemes cel·lulars de túbul proximal renal de ratolí (PCT3 i PR10) i d'humà (HK-2). Per sota d'aquesta dosi la CsA no afecta a la viabilitat cel·lular, per sobre, en canvi, la disminució de la viabilitat és dosi i temps dependent. Aquesta disminució de la viabilitat cel·lular coincideix amb l'aparició de la mort cel·lular per apoptosi, amb una davallada del percentatge de cèl·lules en fase S i una disminució del consum d'oxigen.

2. ESTUDI PROTEÒMIC DIFERENCIAL I IDENTIFICACIÓ DE PROTEÏNES IMPLICADES EN LA TOXICITAT RENAL PRODUÏDA PER LA CsA

Tal i com s'ha descrit al llarg d'aquest treball experimental, les lesions més freqüents causades per la CsA al ronyó són l'atròfia tubular, la fibrosi intersticial i la hialinosi arteriolar (Cattaneo D. et al., 2004). Es desconeixen però, quin són els mecanismes moleculars i/o proteïnes implicades directament en aquest dany renal.

Mitjançant eines d'elevat rendiment com l'anàlisi proteòmic diferencial i l'espectrometria de masses s'han identificat marcadors de túbul proximal renal que ens han de permetre distingir la toxicitat renal creada per la CsA de la resta de símptomes de la nefropatia crònica i determinar l'evolució del dany renal causat per la CsA per tal de poder ajustar el tractament amb dosis de CsA que no siguin tòxiques.

Pel que fa a la viabilitat cel·lular existeix una dosi llimdar de CsA equivalent a 10 μM a partir de la qual aquesta comença a disminuir de manera dosi i temps dependent. En primer lloc i per tal de comprovar si existien canvis proteïcs al sotmetre les cèl·lules al tractament amb CsA i a partir de quina dosi es donaven, es realitzar un anàlisi proteòmic diferencial preliminar de cèl·lules PCT3 tractades amb dosis creixents de CsA (vegeu l'apartat 2.1 dels RESULTATS). Aquest anàlisi revela que l'existència dels canvis proteòmics significatius coincideixen amb la dosi de CsA de 10 μM .

Tot seguit, es realitza un anàlisi proteòmic diferencial de cèl·lules PCT3 i cèl·lules PCT3 tractades amb la concentració 10 μM de CsA i s'identifiquen per espectrometria de masses aquelles proteïnes que modifiquen significativament la seva expressió en presència del fàrmac immunosupressor. De les 38 proteïnes identificades, un 66% disminueixen la seva expressió al sotmetre's al tractament amb CsA i un 34% l'augmenta (TAULA 3). Aquestes proteïnes identificades s'agrupen en 6 categories diferents (vegeu l'apartat 2.2.2. dels RESULTATS). A continuació, i per tal de validar les cèl·lules PCT3

com a model de toxicitat renal causada per la CsA, es comparen els proteomes de les cèl·lules PCT3 amb el de les cèl·lules HK-2. Per a cada proteïna identificada a les cèl·lules PCT3 es busca la seva parella al mapa proteòmic de les cèl·lules HK-2. Els resultat d'aquest estudi revela que només 3 proteïnes queden desaparellades. Per confirmar aquest resultat es seqüencien 11 proteïnes escolliades a l'atzar del proteoma humà. Totes aquestes proteïnes tenen el seu homòleg a ratolí (vegeu TAULA 22).

Les proteïnes relacionades amb el citoesquelet i implicades en l'organització cel·lular com la **cadena lleugera de la miosina**, l'**actina citoplasmàtica** (proteïnes estructurals del citoesquelet), l'**APC-binding protein EB1** (proteïna que participa en la polimerització dels microtúbuls i en l'estabilització del fus mitòtic) i l'**Hsp25-Hsp27** (que participa en l'organització de l'actina) disminueixen la seva expressió al sotmetre's al tractament amb CsA, mentre que la **TCTP** (proteïna que participa en l'estabilització dels microtúbuls), **F-actin capping protein** (proteïna que inhibeix el creixement dels filament d'actina), la queratina 8 (proteïna estructural del citoesquelet) i l'**Anexina 4** (proteïna que participa en la fusió de membranes i en l'exocitosi) són proteïnes que la seva expressió augmenta en presència de la CsA. La **nucleofosmina 1** (component del centrosoma) presenta dues isoformes que es comporten de manera oposada quan es tracten les cèl·lules amb la CsA .

L'alteració de l'expressió d'aquestes proteïnes està de ben segur implicada en el manteniment i l'organització del citoesquelet. Recentment s'ha observat que la queratina 8, filament intermediari de tipus II present en les cèl·lules epitelials, protegeix el teixit del dany funcionant com una fofatsa "esponja" per les quinases activades degut a l'estrés, proporcionant així una nova funció no-mecànica als filaments intermediaris (Ku N.O. et al., 2006).

L'expressió de la proteïna Hsp25-Hsp27 es troba disminuïda en cèl·lules LLC-PK₁ després de tractar-les amb el fàrmac nefrotòxic (DCVC: 1,2-(diclorovinil)L-cisteïna). Aquesta disminució està associada a una reorganització de les adhesions focals, a l'apoptosi i a la pèrdua d'adherència cel·lular (De Graauw M. et al., 2005).

TCTP és una proteïna altament conservada i expressada en tots els organismes eucariotes implicada en diferents processos cel·lulars tals com el creixement cel·lular, el cicle cel·lular, la transformació maligne i la protecció contra determinades condicions d'estrés i l'apoptosi. També se li atribueix una funció extracel·lular de "citoquina-like" implicada en processos patològics rellevants (Bommer U.A. et al., 2004). Recentment s'ha demostrat que ratolins transgènics de TCTP desenvolupen hipertensió arterial 6 setmanes després del naixement. Aquesta hipertensió és causada per la reducció de l'activitat de l'ATPasa de Na⁺-K⁺ i per un increment del Ca²⁺ intracel·lular. Per tant els autors suggereixen que la inhibició de l'activitat de l'ATPasa de Na⁺-K⁺ deguda a la sobreexpressió de TCTP està implicada en la hipertensió arterial (Jung J. et al., 2004 i Kim M.J. et al., 2008). La sobreexpressió de la proteïna TCTP en presència de CsA suggereix que els canvis hemodinàmics produïts pel fàrmac immunosupressor podrien està mitjançats en part per aquest mecanisme en el túbul proximal renal.

L'expressió de la majoria de proteïnes identificades relacionades amb el cicle cel·lular disminueix amb presència de la CsA. Dins aquest grup hi trobem la **PCNA**: *Proliferating Cell Nuclear Antigen* (implicada en el control de la replicació del DNA de cèl·lules eucariotes. També s'utilitza com a marcador de la fase S del cicle cel·lular), la **Hsp8** o **Hsc70** (proteïna que regula l'acumulació de la ciclina D1 i de la quinasa dependent d'aquesta ciclina, la CDK4/6 i la progressió a través del cicle cel·lular, concretament el pas de G1/S) i la **prohibitina** (proteïna que inhibeix la síntesi del cicle cel·lular, també se li atribueix un rol important en la regulació de la respiració mitocondrial i l'envelliment). Dins aquest grup de proteïnes també hi és present la **nucleofosmina 1**. Aquesta és una proteïna multifuncional implicada entre altres en la duplicació dels centrosomes i del DNA.

L'expressió de la nucleofosmina es veu alterada quan es sotmeten les cèl·lules a determinades situacions que provoquen dany al DNA (Wu M.H. et al., 2002). Aquesta proteïna també està implicada en la duplicació dels centrosomes i per tant en la progressió a través del cicle cel·lular. La nucleofosmina s'uneix específicament als centrosomes impeding la seva duplicació. Quan aquesta és fosforilada per la CDK2/ciclina E es separa dels centrosomes permeten la seva duplicació. La inhibició de la fosforilació de la nucleofosmina impedeix la duplicació dels centrosomes. Així la fosforilació de la nucleofosmina és un requisit indispensable perquè es doni la replicació dels centrosomes (Tokuyama Y. et al., 2001 i Tarapore P. et al., 2002). En l'anàlisi proteòmic realitzat en aquest treball experimental la nucleofosmina és representada per dos "spots" amb comportament oposat davant al tractament amb CsA (l'*spot* núm. 2536 l'expressió proteica disminueix i l'*spot* núm. 3501 l'expressió proteica augmenta, vegeu Taula 21). Aquest fet, conjuntament amb la literatura, permeten hipotetitzar que la proteïna que presenta la seva expressió disminuïda equivaldria a és la nucleofosmina fosforilada i la que més s'expressa seria la nucleofosmina no fosforilada. D'aquesta manera s'inhibiria la duplicació dels centrosomes que acabaria produïnt una disminució del percentatge de cèl·lules en fase S, fet que s'observa a les cèl·lules PCT3 i HK-2 quan es sotmeten al tractament amb CsA. Aquests resultats també explicarien el baixos nivells de proteïna PCNA i Hsp8. La PCNA, tal i com s'ha dit anteriorment, és un marcador de la fase S, és a dir quantes menys cèl·lules hi hagi en fase S menys expressió de PCNA hi haurà. La proteïna Hsp8 participa en la maduració de la ciclina D1 i en l'ensamblatge de la ciclina D1 amb la CDK4/6. Aquest complex permetrà l'entrada de les cèl·lules a la fase S (Diehl J.A. et al., 2003). Si no es forma el complex ciclina D1-CDK4/6 les cèl·lules no poden progressar a través de la fase S.

Les proteïnes implicades en el dany cel·lular, són majoritàriament xaperones (**Hsp8**, **Hsp25**, **α -B-cristalina**), proteïnes relacionades amb les espècies reactives d'oxigen (**perxiredoxina 4 i 6**), proteïnes relacionades amb el dany al DNA (**PCNA**, **nucleofosmina**) i proteïnes anti-oxidants o detoxificadores com la **Glutathione transferase omega-1**. El comportament de la majoria d'aquestes proteïnes és de disminuir en presència del fàrmac, exceptuant el de la nucleofosmina i el de la **Glutathione transferase omega-1** que presenten dues isoformes de comportament oposat. No deixa de ser un resultat inesperat, ja que l'expressió de la majoria de proteïnes que responen a una agressió tendeix a augmentar. Aquesta situació ens porta a pensar que segurament aquestes proteïnes

presenten altres funcions més específiques relacionades exclusivament amb el dany causat per la CsA. Algunes d'aquestes funcions s'han detallat anteriorment.

Pel que fa a les proteïnes implicades al metabolisme energètic ens trobem:

- 1- Disminució de l'expressió de l'**electron transfer flavoprotein alpha subunit**. Aquesta proteïna accepta els electrons provinents de les deshidrogenases i els transfereix a la cadena de transport d'electrons.
- 2- Disminució de l'expressió de la **cadena D de l'ATP sintetasa mitocondrial**. Aquesta proteïna és l'últim component de la cadena respiratòria mitocondrial responsable de sintetitzar ATP a partir d'ADP + Pi i el gradient de protons generat al llarg de la cadena respiratòria.
- 3- Disminució de l'expressió de l'enzim isocitrat deshidrogenasa, enzim clau del cicle de *Krebs*, responsable de la conversió de l'**isocitrat a α -cetoglutarat**.
- 4- Disminució de l'expressió de la **T-complex protein 1** o **Acetil-CoA-acetiltransferasa**. Enzim responsable de la formació de l'Acetil-CoA en el procés de la β -oxidació dels àcids grassos.
- 5- Disminució de l'expressió de la **prohibitina**. Aquesta és una proteïna altament conservada, localitzada a la membrana mitocondrial interna i entre d'altres funcions està implicada en l'ensamblatge d'enzims de la cadena respiratòria. La seva expressió està relacionada amb els nivells d'activitat mitocondrial (Coates P.J. et al., 2001). Recentment s'ha demostrat que la falta de prohibitina en cèl·lules epitelials augmenta els nivells mitocondrials de ROS degut a la inactivació del complex I de la cadena de transport d'electrons. Com a resultat final s'indueix la senescència cel·lular (Schleicher M. et al., 2008).
- 6- Augment de l'expressió de la **piruvat quinasa**. És l'últim enzim de la glucòlisi. El següent pas divergeix el flux o bé cap al cicle de *Krebs* mitjançant la formació Acetil-CoA o cap a la glucòlisi anaeròbica mitjançant la formació de lactat.

El comportament de les 5 primeres proteïnes indicaria que el metabolisme aeròbic està alentit probablement degut a una disfunció de la cadena respiratòria mitocondrial. Com a conseqüència d'aquesta disfunció mitocondrial, el cicle de *Krebs* es veu inhibit perquè el NADH que es sintetitza no es pot utilitzar per a formar ATP a la cadena de transport d'electrons. La β -oxidació també es veu alentida ja que l'acetil-CoA format no pot entrar al cicle de *Krebs*. Aquests resultats correlacionen amb els reportats per altres autors que demostren que el tractament de rates amb CsA, disminueix el balanç energètic ATP/ADP en ronyó, fetge i cervell. Aquesta disminució és deguda a un descens de l'activitat mitocondrial del cicle de *Krebs* i de la fosforilació oxidativa (Serkova N. et al., 2003). Posteriorment, aquests mateixos autors demostren que la CsA a part d'inhibir la producció d'energia, el cicle de *Krebs* i la fosforilació oxidativa, activa la glucòlisi anaeròbica augmentant els nivells de lactat. Aquest és un mecanisme compensatori que s'activa després d'inhibir el metabolisme mitocondrial (Christians U. et al., 2004; Rodríguez L.C. et al., 2007). El fet de trobar-nos l'expressió de la piruvat quinasa augmentada fa pensar que la CsA en les nostres cèl·lules també activa la glucòlisi anaeròbia, ja que al tenir el cicle de *Krebs* i la fosforilació oxidativa inhibits és la única manera que

tenen les cèl·lules per obtenir energia. Per acabar de corroborar la hipòtesi caldria mirar els nivells de lactat d'aquestes cèl·lules sotmeses al tractament amb el fàrmac immunosupressor. Aquests fets també podrien contribuir en la disminució del consum d'oxigen observada al sotmetre les cèl·lules al tractament amb CsA durant diferents temps (vegeu l'apartat 1.1.4 del RESULTATS).

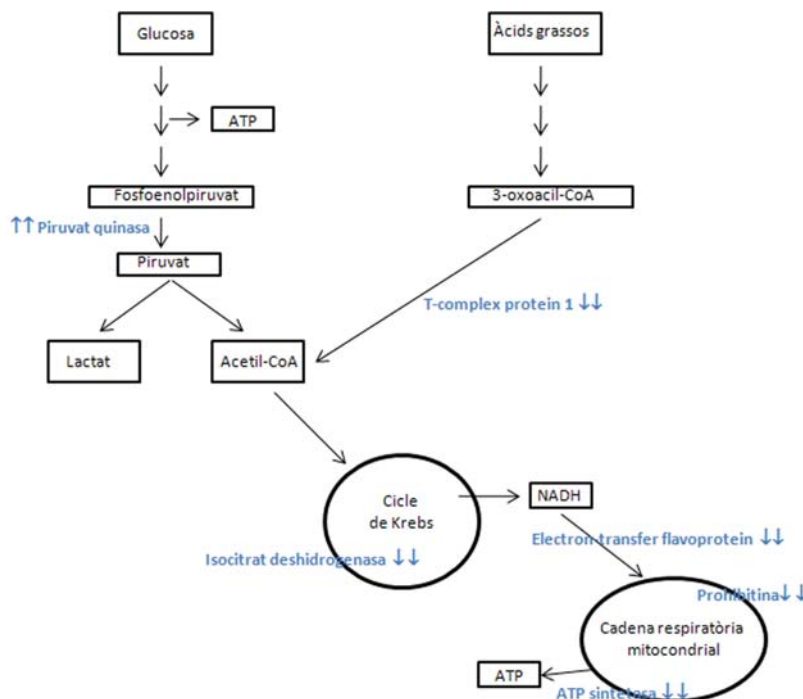


Figura 54. Esquema representatiu de la hipòtesi del metabolisme energètic. En blau s'indiquen les diferents proteïnes alterades pel tractament amb CsA. Les fletxes indiquen l'estat de l'expressió proteica després del tractament.

El grup de proteïnes relacionades amb el metabolisme proteic estan implicades en una gran varietat de processos. Així hi trobem l' ***α-complex protein 1*** (relacionada amb el processament de l'mRNA), l' ***eukarotic traslation initiation factor 5A*** (inicialment identificat com a factor iniciador de la síntesi proteica, recentment també s'ha observat que participa en la fase d'elongació de la traducció proteica (Zanelli C.F. et al., 2006), l' **Hsp8** i la **CypA** (proteïnes que participen en el plegament proteic), l' ***α-B-cristalina*** (està implicada en varis processos com el plegament proteic, en la organització de l'actina i recentment s'ha vist que protegeix a determinades proteïnes de l'agregació en condicions d'estrès (Ghosh J.G. et al., 2007) i la **NACA** (direcciona les proteïnes secretores cap al reticle endoplasmàtic). Aquestes proteïnes en presència de CsA disminueixen la seva expressió mentre que l'expressió proteica de les subunitats del **proteosoma *α-2*** i ***β-4*** es veu augmentada quan es tracten les cèl·lules amb el fàrmac. Aquests resultats indicarien una inhibició dels processos de síntesi, probablement causada per la disminució energètica induïda pel dany mitocondrial causat per la CsA i un augment dels processos de degradació proteica com a conseqüència de l'elevat nombre de proteïnes mal processades i/o mal plegades.

L'últim grup de proteïnes el componen alguns dels enzims que regulen el metabolisme dels àcids nucleics. L'enzim ***Uridin monophosphate synthetase*** implicat en la síntesi de les pirimidines

presenta una expressió proteica disminuïda. Contràriament els enzims *S-methyl-5-thioadenosine phosphorilase* i *purine nucleotide phosphorilase* (PNP) que participen en la via de recuperació de les purines, la seva expressió augmenta en presència de la CsA. Aquests fets permeten hipotetitzar una disminució de la síntesi de les purines com a conseqüència de la poca disponibilitat d'energia degut a la inhibició de la cadena respiratòria mitocondrial. Aquest fet provocaria una elevada concentració de nucleòtids que activaria la via de salvament de les purines, menys costosa energèticament.

Per tal de corroborar aquest estudi proteòmic, es comprova mitjançant *Western blot* el comportament d'algunes de les proteïnes, concretament de l' α -B-cristalina, la NACA, la CypA i la RACK-1. Mentre la variació de l'expressió de les proteïnes CypA, α -B-cristalina i NACA és consistent amb l'anàlisi proteòmic, la RACK-1 no segueix el mateix perfil d'expressió proteica. Al analitzar els *Westerns blots* realitzats a partir de gels bidimensionals s'observa com les proteïnes RACK-1 i CypA presenten un conjunt d'isoformes equivalents a canvis post-traduccionals. Aquests canvis no són visibles en els *Westerns blots* realitzats a partir de gels unidimensionals. El tractament amb el fàrmac immunosupressor CsA afecta de manera diferencial les isoformes de RACK-1 sense alterar però la quantitat total de la proteïna (fet que s'observa al *Western blot* provinent de gels unidimensionals). La CsA, en canvi, disminueix l'expressió de totes les isoformes de la CypA disminuint també la quantitat total de la proteïna.

Des d'un punt de vista tècnic la informació que s'obté dels *Westerns blots* de gels procedents d'una sola dimensió i de l'anàlisi diferencial pot ser contradictòria si les diferents isoformes d'una proteïna es veuen afectades de manera diferencial per la CsA i només se'n sequencia una. L'anàlisi proteòmic diferencial només ens informa dels canvis d'expressió proteica existents entre dues situacions diferents. L'estudi de l'existència de diferents isoformes i el comportament d'aquestes davant el tractament de qualsevol fàrmac s'ha de realitzar *a posteriori*.

Seguidament es va voler estudiar el comportament d'aquestes proteïnes en ronyons de ratolí tractats amb CsA. S'observa que el comportament de les proteïnes α -B-cristalina, NACA i RACK-1 és molt similar al trobat a les cèl·lules PCT3. Els nivells proteics de la CypA en canvi són molt similars als nivells dels ratolins control. Tal i com s'ha comentat anteriorment la ciclofilina A és una proteïna que s'expressa en tots els tipus cel·lulars. Ara bé el que suggereix aquest resultat és que en relació a la CypA les cèl·lules tubulars renals són més sensibles que qualsevol altre tipus cel·lular al tractament amb CsA. Així la quantitat de CypA total present en el ronyó queda enmascarada pels diferents tipus cel·lulars que el formen.

En resum, aquesta part del treball experimental ens ha permès identificar uns marcadors putatius de toxicitat renal induïda per la CsA en les cèl·lules del túbul proximal renal. A continuació, aquests marcadors seran àmpliament estudiats per tal de determinar si són exclusius del dany renal causat per la CsA o també són presents quan es tracten les cèl·lules amb altres immunosupressors com l'FK506 o bé, també són comuns en altres formes de dany renal. Caldria també determinar la cor-

relació d'aquests marcadors amb els paràmetres que s'utilitzen actualment per monitoritzar la progressió del dany renal agut, com són els nivells de creatinina en sèrum i els nivells de urea en sang, paràmetres que només varien després d'un dany renal important.

Algunes d'aquestes proteïnes podrien arribar a ser marcadors sensibles, específics i fiables per a la detecció primerenca del dany renal agut causat per la CsA.

3. ELIMINACIÓ DE L'EXPRESSIÓ GÈNICA DE LES CICLOFILINES A I B. ESTUDI DE L'EFECTE DE LA CsA EN ABSÈNCIA DELS SEUS RECEPTORS, LA CypA I LA CypB

Les ciclofilines són una família de proteïnes expressades de forma ubiqua que posseeixen activitat peptidil-prolil cis/trans isomerasa i que s'uneixen selectivament al fàrmac immunosupressor CsA. Aquesta activitat PPLasa és inhibida en presència del fàrmac (Galat A., 1993; Göethl et al., 1999).

El mecanisme pel qual la CsA produeix la immunosupressió als limfòcits T està àmpliament estudiat i descrit. Hi ha autors que postulen que la nefrotoxicitat induïda per la CsA 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 limfòcits T es dona també via inhibició de la calcineurina (Sigal N.H. et al., 1995). D'altres autors, en canvi, defensen que és l'activitat PPLasa de les ciclofilines la responsable de la toxicitat renal produïda per la CsA (Hong F. et al., 2004). El que es desconeix, és la participació de les ciclofilines A i B en el dany renal causat per la CsA

Utilitzant la tècnica d'RNAi, s'han creat durant aquest treball experimental, uns models cel·lulars de túbul proximal renal que tenen l'expressió de la CypA o de la CypB notablament disminuïda (un 75% i 85% respectivament).

En primer lloc s'ha estudiat la sensibilitat d'aquests clons cel·lulars a la CsA. Els resultats demostren que la disminució de la viabilitat comença a evidenciar-se a partir de la dosi 20 μ M de CsA. No hi ha diferències de sensibilitat al fàrmac en funció de la ciclofilina que estigui interferida. Cal recordar que la disminució de la viabilitat en cèl·lules PCT3, HK-2 i el control negatiu es fa palesa a partir de la dosi de 10 μ M de CsA (vegeu les FIGURES 35 i 51). D'aquesta manera podem dir que les cèl·lules que tenen una de les dues ciclofilines interferides són menys sensibles a la toxicitat per CsA, per tant la presència de les ciclofilines és necessària perquè la toxicitat cel·lular causada per la CsA aparegui en dosis inferiors.

Pel que fa a l'estudi de l'apoptosi es demostra que igualment que a les cèl·lules HK-2 i PCT3 aquesta només és present a les dosis de 10 μ M i 20 μ M de CsA. També s'observa com l'apoptosi present en els clons interferits, sobretot quan es disminueix l'expressió de la CypA, és sensiblement inferior a l'apoptosi detectada a les cèl·lules control. Recordem que tot i detectar apoptosi a la concentració de 10 μ M de CsA la viabilitat cel·lular en aquesta dosi no disminueix. Aquest fet suggereix que per aquesta dosi de fàrmac aquests nivells d'apoptosi no són suficients per detectar una davallada significativa de la viabilitat cel·lular.

Tal i com s'ha comentat a l'apartat de RESULTATS, els clons cel·lulars amb l'expressió de la CypA disminuïda presenten un alentiment de l'adhesió cel·lular. Aquests resultats suggereixen que l'absència de la CypA afectaria a proteïnes implicades directament amb processos relacionats amb l'adhesió cel·lular.

A continuació, es realitza un anàlisi proteòmic diferencial entre les cèl·lules que presenten una de les dues ciclofilines interferides i les cèl·lules transfectades amb un siRNA control que no presenta homologia amb cap proteïna dipositada als bancs de dades. Aquest anàlisi revela 49 proteïnes diferencialment expressades per a les cèl·lules amb la CypA interferida. S'han identificat 25 proteïnes, 22 de les quals presenten una expressió disminuïda i 3 augmentada. Per a la CypB es detecten 68 proteïnes que presenten una expressió diferencial. Se n'han identificat 21, el 90,5% presenten una disminució de l'expressió i el 9,5 restant presenta una expressió augmentada. Les proteïnes identificades les separem en tres grans grups:

1) Proteïnes que són comuns quan s'interfereixen les ciclofilines: cadena α -3 de la Tropomiosina, LASP-1 (LIM i SH3 domain protein 1), Lgul (*lactoylglutathione lyase*), PEPB-1 (*phosphatidylethanolamine-binding protein 1*), proteïna homòloga a C15orf38 (no caracteritzada), proteïna crk, KCY (*UMP/CMP kinase*), *cofilin-1*, *selenium binding protein 1*, PGAM-1 (*phosphoglycerate mutase 1*), *glutathione transferase omega-1*, *FUSE binding protein-1 (far upstream element binding protein 1)* i Anexina A4.

Gran part d'aquestes proteïnes estan implicades en l'estabilització i formació del citoesquelet i en l'organització cel·lular. Així, la tropomiosina participa en l'estabilització del citoesquelet i dels filaments d'actina, la LASP-1 regula l'activitat del citoesquelet dependent d'actina. Aquesta és també una proteïna específica de les adhesions focals implicades en la migració cel·lular (Keicher C. et al., 2004). La cofilina-1 regula la polimerització/despolimerització de l'actina i l'anexina A4 és una proteïna d'unió a calci i fosfolípids implicada en la fusió de membranes i l'exocitosi. L'expressió de totes aquestes proteïnes disminueix quan s'interfereixen les ciclofilines A o B. Aquest comportament podria ser el causant d'una desestabilització dels filaments d'actina i del citoesquelet en general, afectant també la capacitat d'adhesió cel·lular. Recordem que els clons amb la CypA disminuïda presenten un alentiment de l'adhesió cel·lular. Aquest fenomen però, no s'observa a les cèl·lules interferides amb la CypB. Una possible explicació a aquest fet podria ser que la disminució de la ciclofilina citosòlica, localització majoritària de la CypA, afecta a moltes més proteïnes implicades en l'adhesió i estabilització cel·lular localitzades al citoplasma. Per tal de corroborar aquesta hipòtesi, caldria identificar moltes més proteïnes que siguin exclusives d'una o altra interferència.

2) Proteïnes comuns entre la interferència de la CypA o CypB i el tractament de cèl·lules PCT3 amb 10 μ M de CsA: TCTP, *chloride intracellular channel protein 1*, Anexina A4, cadena D de l'ATP sintetasa mitocondrial, isocitrat deshidrogenasa 3, Hsp27, actina citoplasmàtica 2, α -cristalina, *elec-*

tron transfer flavoprotein alpha, *T-complex protein 1* (Acetil-CoA acetiltransferasa citosòlica) i piruvat quinasa (isoenzim M2).

Dins aquest gran grup de proteïnes, cal destacar les implicades en el metabolisme enrgètic: la cadena D de l'ATP sintetasa mitocondrial, l'isocitrat deshidrogenasa 3, l'*electron transfer flavoprotein alpha*, la *T-complex protein 1* (Acetil-CoA acetiltransferasa citosòlica) i la piruvat quinasa (isoenzim M2). Aquests resultats indicarien que tant el tractament amb la CsA com la interferència de la CypA o CypB inhibeix el metabolisme aeròbic. La única diferència existent entre ambdues situacions és el comportament de l'enzim piruvat quinasa que augmenta l'expressió proteica en presència de CsA i disminueix al interferir una de les dues ciclofilines.

Aquest últim resultat ens evidencia que el comportament d'algunes proteïnes es veu igualment afectat pel tractament amb CsA i per la interferència de les ciclofilines, mentre que el comportament d'altres proteïnes, és afectat diferencialment segons si es tracten les cèl·lules amb CsA o s'interfereixen les ciclofilines. Aquest darrer punt podria ser degut a que la interferència de les ciclofilines a part d'inhibir l'activitat PPIasa d'aquestes també ens pot està afectant alguna de les múltiples funcions descrites per les ciclofilines (vegeu els apartats 3.2.1 i 3.2.2 de l'INTRODUCCIÓ) o alterant el comportament de les proteïnes que s'ha vist que interaccionen amb elles.

3) Proteïnes exclusives de la interferència de CypA: Anexina A2, i aldosa reductasa i Proteïnes exclusives de la interferència de CypB: Vimentina, IBA2 (*ionized calcium-binding adapter molecule 2*), glutamat deshidrogenasa i *voltage dependent anion selective channel protein 1*.

Per tal de estudiar quines són els mecanismes moleculars alterats exclusivament per la disminució d'una ciclofilina en concret, calen identificar moltes més proteïnes. Actualment s'està treballant en aquest punt. Al nostre laboratori també s'han creat clons estables mutants per a l'activitat PPIasa de la CypA (tesi doctoral de Guillermo Suñé) l'estudi proteòmic dels quals ens permetrà distingir només les proteïnes diana de l'activitat peptidil-prolil cis/trans isomerasa de la CypA de les altres funcions que aquesta realitza.

L'estudi dels diferents models cel·lulars creats més el tractament de cada un d'ells amb la CsA, ens permetran desglosar i esbrinar la participació de la CsA, les ciclofilines A i B o bé l'activitat PPIasa d'aquestes en la toxicitat renal.