



IDENTIFICACIÓ DE BIOMARCADORS PRECOÇOS DE NEFROTOXICITAT INDUÏDA PER FÀRMACS ANTICALCINEURÍNICS

Tesi presentada per

Conxita Jacobs Cachá

Per optar al grau de Doctor en Bioquímica, Biologia molecular i Biomedicina.

Tesi inscrita al departament de Bioquímica de la Universitat Autònoma de Barcelona i realitzada al grup de Fisiopatologia Renal del CIBBIM-Nanomedicina/ Institut de Recerca Hospital Universitari Vall d'Hebrón sota la direcció dels doctors Anna Meseguer Navarro i Eduard Sarró Tauler.

Dra. Anna Meseguer Navarro

Dr. Eduard Sarró Tauler

Conxita Jacobs Cachá

Barcelona, Setembre 2013

Als Pacients,
que creuen en la recerca

Als meus pares i germans,
Al Miquel,

AGRAÏMENTS

“Busquem quedar bé en el retaule magnífic,
dels que van pel món amb posat monolític
i afronten la vida mirant-la a la cara
i un dia, contents, compren flors a sa mare.
Intentem trampejar per ser persones dignes.
El pare modèlic que volen les filles,
el de la veu greu, el de la mà forta,
que paga un vermut i que arregla una porta.
I després tancar els ulls i sentir el món en calma,
hi ha dos ocellets fent piu-piu dalt d'un arbre.
Havent enllestit un gran epitafi
que arranqui somriures a tots els que passin.

I a vegades ens en sortim,
i a vegades ens en sortim.
I a vegades una tonteria de sobte ens indica que ens en sortim.
I a vegades una carambola de sobte ens demostra que ens en sortim”

Captatio benevolentiae
Manel

Sí, a vegades ens en sortim...però això no hagués estat possible sense les persones que m'han acompanyat durant aquesta aventura. Com diria aquell...“Aquesta tesi és més vostra que meva!”

A la gent del laboratori, **MOLTES GRÀCIES!** Gràcies Anna per haver-me donat la oportunitat de treballar i realitzar la tesi en un grup tant genial. Joan (Juanito, Juanito...) gràcies per la teva amistat, els teus consells i per ensenyar-me proteòmica i anàlisi de dades. Edu, gràcies per les correccions, per dir-me sempre que si no surten els experiments no és culpa meva, pels riures i per fer de mi una “Màster dels WB”. Thais i Bea (la morena i la rúbia) gràcies per ser unes grans amigues i co-becàries, amb vosaltres un no s'avorreix mai! Si tingués una altra vida voldria ser una fusió de vosaltres (Guapes!!). Natàlia, companya de carrera, de bus, de feina, de tapes i pel que calgui, gràcies per haver aguantat el meu mal humor durant els últims dies al laboratori. No canviïs mai! Agrair també a la Maria per les xerrades i al Toni pels acudits (no sempre bons, eh!). A la Noe, la Sònia, la Cris, l'Ana Rico, la Haizea, l'Andrea, la Theana, la Cecilia, l'Esther, la Gina, la Vero i la Gemma (si em deixo algú perdoneu-me!), gràcies per haver passat pel laboratori i fer que els dies fossin més curts. A la gent que hi havia quan vaig arribar (Guillermo, Olga i Luz) gràcies per acollir-me, en guardo un bon record. I Nerea, eres una gran incorporació, gracias por ser tan cariñosa.

Als de la meva segona casa, als de Nefrologia, gràcies per ajudar-me en tot el que he necessitat. Gràcies Carme per confiar en el projecte, per animar-me en els moments més baixos i per ensenyar-me a entendre una mica més el ronyó. Als Drs. Serón i Moreso, gràcies per deixar que entrés a cada racó del Servei i per consells clínics. A la Irina, gracias por las “mil y una” muestras que me has cedido y por intentar enseñarme histopatología renal, sin ti esto no sería una realidad. Toña i Natàlia Ramos, gràcies per les mostres d'IRC. Maria i Oreto, gràcies per recollir mostres casi a la carta, sou uns sols. I a la Conxita per tractar-me sempre amb amabilitat i per donar-me telèfons de pacients.

A la Dra. Pelegrí, la Maribel, la Paula i la resta de companys de Bioquímica, gràcies per les mesures de creatinina i de proteïnes i per assessorar-me amb els ELISA. És molt agradable treballar amb persones com vosaltres.

Al Dr. Román, que tot i que no el conec, li he d'agrair haver comptat amb les mostres de pacients trasplantats de pulmó.

Als de Diabetis i Metabolisme, Pep, Rosi, Natàlia Enguix i Jaime, ha estat un plaer haver compartit el laboratori amb vosaltres. Al personal de la resta de laboratoris (als de Neuroimmuno, al Jorge, al Jordi i un llarg etc.) i al personal del VHIR (Nuri, Anna, Fàtima, Pablo, José Luís, Xavi, Quim, Loli, Montse), moltes gràcies per fer que trobi molt a faltar els passadissos del VHIR. Companys de “Can Kinasic” de l'Autònoma, Jordi, Ton i Fani, gràcies per adoptar-me de tant en tant.

Amics meus varis (de l'insti, de la uni, “biomúnia”, les nenes, la meva amiga més vella, amics del Miquel però que ara ja sou amics meus) gràcies pels moments (dinars, farres, paelles, sortides “porai”), no puc imaginar una vida on no us hagués trobat pel camí. Als del 15-M, gràcies pel vostre sentit crític. Als del Raïm Guitar, fer música amb vosaltres és el meu “Spa” particular, gràcies per això i per les colònies.

Als meus pares, per creure en mi de forma incondicional, per ensenyar-me el valor de ser lliure i pel seu amor infinit. A la meva germana, que es la millor del món, gràcies per estimar-me tant i arreplegar-me quan estic feta caldo. Al meu *brother*, gràcies per fer-nos riure sempre, ets un crack. Us estimo! Als meus tiets i cosins, gràcies per ser una família singular i estupenda. A la meva família política, gràcies per haver-me rebut des del principi amb els braços oberts.

I finalment, Miquel, tu que rius quan jo ploro perquè ets incapaç de veure'm trista, gràcies per estimar-me com ho fas.

ÍNDEX

RESUM.....	10
ABREVIATURES	12
INTRODUCCIÓ	15
1. L'APARELL URINARI	16
2. EL RONYÓ	16
2.1. LA NEFRONA	18
3. LA INSUFICIÈNCIA RENAL.....	20
3.1. LA INSUFICIÈNCIA RENAL AGUDA.....	20
3.2. LA INSUFICIÈNCIA RENAL CRÒNICA.....	21
3.2.1. Causes de la Insuficiència Renal Crònica	21
3.2.2. Evolució de la Insuficiència Renal Crònica	22
3.2.3. Mecanismes d'evolució de la Insuficiència Renal Crònica.....	22
4. TRACTAMENTS SUBSTITUTIU DE LA FUNCIÓ RENAL.....	23
4.1. MÈTODES DE DIÀLISI	24
4.2. EL TRASPLANTAMENT RENAL	24
4.2.1. Procediment quirúrgic i selecció de donants	24
4.2.2. Fàrmacs immunosupressors	26
4.2.3. Terapèutica immunosupressora	31
5. LA NEFROPATIA CRÒNICA DE L'EMPELT.....	32
6. NEFROTOXICITAT PER FÀRMACS ANTICALCINEURÍNICS	35
6.1. <i>PATOGENIA I LESIONS HISTOLÒGIQUES ASSOCIADES A LA NEFROTOXICITAT PER CNIs</i>	35
6.2. <i>MECANISMES DE NEFROTOXICITAT DELS CNIs</i>	38
6.2.1. Mecanismes de nefrotoxicitat aguda	39
6.2.2. Mecanismes de nefrotoxicitat crònica	40
6.3. <i>FACTORS DE RISC DE LA NEFROTOXICITAT PER CNIs</i>	44
7. DIAGNÒSTIC DIFERENCIAL I MARCADORS DE NEFROTOXICITAT PER FÀRMACS CNIs....	45
7.1. <i>VALORACIÓ DE LES LESIONS HISTOLÒGIQUES CAUSADES PER CNIs I NOVES APROXIMACIONS MOLECULARS</i>	45
7.2. <i>BIOMARCADORS CLÀSSICS NO INVASIUS DE DISFUNCIÓ RENAL</i>	47
7.2.1. Urea i creatinina sèrica.....	48
7.2.2. Proteïnúria i albuminúria.....	50
7.3. <i>NOUS BIOMARCADORS NO INVASIUS DE DANY RENAL. RELACIÓ AMB NEFROTOXICITAT PER CNIs</i>	51
7.4. <i>CAMPS EMERGENTS EN LA CERCA DE BIOMARCADORS NO INVASIUS</i>	54
7.5. <i>PROBLEMA DELS MARCADORS DE FUNCIÓ RENAL EXISTENTS. NECESSITAT DE NOUS BIOMARCADORS</i>	56

OBJECTIUS	59
MATERIALS, MÈTODES I PACIENTS	62
1. DISSENY EXPERIMENTAL	63
2. CULTIUS CEL·LULARS	68
2.1. LÍNIA CEL·LULAR.....	68
2.2. CONDICIONS DE CULTIU	68
2.3. MANTENIMENT I TRIPSINITZACIÓ DE CÈL·LULES HK-2.....	69
2.4. RECOMPTE DE CÈL·LULES I SEMBRA	70
2.5. TRACTAMENTS DE CÈL·LULES HK-2.....	71
3. ESTUDI DE LA TOXICITAT CEL·LULAR	73
4. ANÀLISI DE PROTEÏNES	74
4.1. RECOLLIDA DE MEDIS CEL·LULARS	74
4.1.1. Anàlisi per Western Blot	74
4.1.2. Anàlisi per Electroforesi Bidimensional	74
4.2. EXTRACCIÓ DE PROTEÏNES DE CULTIUS CEL·LULARS.....	75
4.3. SDS-PAGE D'UNA DIMENSIÓ I WESTERN BLOT (WB).....	76
4.4. ELECTROFORESI BIDIMENSIONAL (2D)	81
4.4.1. Primera etapa: Isoelectroenfoc (IEF) o primera dimensió.....	81
4.4.2. Segona etapa: SDS-PAGE o Segona Dimensió	82
4.5. TINCIÓ DE PROTEÏNES AMB COMASSIE COL·LOIDAL	84
4.6. ANÀLISI I PROCESSAT D'IMATGES.....	85
4.6.1. Anàlisi i processat de pel·lícules de raigs X	85
4.6.2. Anàlisi i processat dels gels bidimensionals	85
4.7. ASSAJOS ELISA.....	86
5. OBTENCIÓ I PROCESSAT DE MOSTRES BIOLÒGIQUES	87
5.1. PLASMA.....	87
5.2. ORINA	88
5.2.1. Anàlisi per ELISA.....	88
5.2.2. Aïllament d'exosomes	88
6. PACIENTS	89
6.1. GRUP DE PACIENTS TRASPLANTATS DE RONYÓ	90
6.2. GRUP DE PACIENTS AMB INSUFICIÈNCIA RENAL CRÒNICA.....	95
6.3. GRUP D'INDIVIDUS SANS	96
6.4. GRUP DE PACIENTS TRASPLANTATS DE PULMÓ.....	97
7. ANÀLISI ESTADÍSTICA	98
ANNEX MATERIALS I MÈTODES	100
1. COMPOSICIÓ DELS TAMPONS UTILITZATS.....	101

1.1. TAMPONS PER A CULTIUS CEL·LULARS I EXTRACCIÓ DE PROTEÏNES DE CULTIUS CEL·LULARS	101
1.2. TAMPONS PER A WESTERN BLOT	103
1.3. TAMPONS PER A ELECTROFORESI BIDIMENSIONAL	104
RESULTATS	106
1. DETERMINACIÓ DE LES CONDICIONS SUBTÒXIQUES DE LES DIFERENTS NOXAS	107
2. ANÀLISI PROTEÒMIC DELS MEDIS CONDICIONATS	109
3. IDENTIFICACIÓ DE LES PROTEÏNES DIFERENCIALMENT SECRETADES I SELECCIÓ DE LES PROTEÏNES A TESTAR EN PACIENTS	114
4. VALIDACIÓ DE LA SECRECIÓ FASCINA-1 PER TÈCNiques ALTERNATIVES	118
5. VALIDACIÓ DE PAI-1 I FASCINA-1 COM A BIOMARCADORS DE TOXICITAT PER CNIs	120
5.1. DETECCIÓ DE PAI-1 EN SANG I ORINA DE PACIENTS TRANSPLANTATS DE RONYÓ	121
5.1.1. Comparació dels nivells de PAI-1 urinaris amb els de PAI-1 sanguinis	125
5.2. DETECCIÓ DE FASCINA-1 EN SANG I ORINA DE PACIENTS TRASPLANTATS DE RONYÓ	127
5.2.1. Comparació dels nivells de Fascina-1 urinaris amb els de Fascina-1 sanguinis	131
5.3. CORRELACIÓ DELS NIVELLS PAI-1 I FASCINA-1 EN SANG I EN ORINA AMB MARCADORS DE DISFUNCIÓ RENAL CONEGUTS.	133
5.3.1. Valoració dels nivells de creatinina sèrica i la proteïnúria en els diferents grups de pacients	133
5.3.2. Valoració dels nivells urinaris de KIM-1 i NGAL en els diferents grups de pacients	135
5.3.3. Correlació de PAI-1 en sang i en orina amb marcadors de funció renal coneguts	138
5.3.4. Correlació de Fascina-1 en sang i en orina amb marcadors de funció renal coneguts.	143
5.4. RELACIÓ DELS NIVELLS DE PAI-1 I FASCINA-1 AMB LA INICACIÓ DE LA BIÒPSIA I EL DIAGNÒSTIC HISTOPATOLÒGIC SEGONS ELS CRITERIS DE BANFF	148
5.4.1. Relació dels nivells de PAI-1 en sang i en orina amb la indicació de la biòpsia i el diagnòstic histopatològic	149
5.4.2. Relació dels nivells de Fascina-1 en sang i en orina amb la indicació de la biòpsia i el diagnòstic histopatològic	153
5.5. ANÀLISI DE PAI-1 I FASCINA-1 RESPECTE ELS SIGNES HISTOLÒGICS DE NEFROTOXICITAT PER CNIs: VACUOLITZACIÓ ISOMÈTRICA I HIALINOSI ARTERIOLAR.	156
5.5.1. Anàlisi dels nivells de PAI-1 en sang i en orina respecte els signes de nefrotoxicitat per CNIs	156
5.5.2. Anàlisi dels nivells de Fascina-1 en sang i en orina respecte els signes de nefrotoxicitat per CNIs	160
5.6. ANÀLISI DE PAI-1 I FASCINA-1 RESPECTE ALS NIVELLS SISTÈMICS DE FK-506	163
5.6.1. Correlació entre els nivells de PAI-1 en sang i en orina i els nivells sistèmics de FK-506	163

5.6.2. Correlació entre els nivells de Fascina-1 en sang i en orina i els nivells sistèmics de FK-506	164
6. DETECCIÓ DE FASCINA-1 EN ORINA DE PACIENTS TRASPLANTATS DE PULMÓ	166
7. DETECCIÓ DE FASCINA-1 EN EXOSOMES DE PACIENTS TRASPLANTATS.....	171
8. ROL DE LA PROTEÏNA QUINASA C (PKC) EN L'ALLIBERACIÓ DE FASCINA-1 AL MEDI DE CULTIU DE CÈL·LULES HK-2.....	173
DISCUSSIÓ.....	176
1. ESTUDI DEL MEDI CONDICIONAT DE CÈL·LULES TUBULARS PER A IDENTIFICAR NOUS BIOMARCADORS DE DANY RENAL.....	178
2. PAPER DE PAI-1 EN PATOLOGIA RENAL	184
3. FASCINA-1 PODRIA INDICAR DANY RENAL PER FÀRMACS CNIs.....	188
3.1. <i>ORIGEN DE LA FASCINA-1 URINÀRIA EN PACIENTS TRASPLANTATS.....</i>	<i>191</i>
3.2. <i>MODEL DE MECANISME D'INCORPORACIÓ DE FASCINA-1 ALS EXOSOMES URINARIS.....</i>	<i>193</i>
CONCLUSIONS.....	196
BIBLIOGRAFIA.....	198
ANNEX.....	220

RESUM

El trasplantament renal ha suposat una millora significativa de la qualitat de vida dels pacients amb dany renal crònic. Tot i això, l'empelt acaba perdent funcionalitat i es desenvolupa una patologia anomenada nefropatia crònica de l'empelt (CAN). Les causes d'aquesta patologia poden ser el rebuig immunològic de l'empelt renal o d'altres lesions com les causades per la isquèmia-reperfusió pròpies del procés quirúrgic o les degudes al propi tractament immunosupressor amb fàrmacs anticalcineuríncs (CNIs), Ciclosporina A (CsA) o FK-506. Els mètodes de mesura de la funció renal tradicionals com ara els nivells de creatinina en sèrum i la taxa de filtració glomerular, no permeten fer un diagnòstic de disfunció renal a l'inici i precis que permeti distingir el dany causat per factors immunològics dels no immunològics, com per exemple la nefrotoxicitat per fàrmacs CNIs. Per aquest motiu, l'objectiu d'aquesta tesi és la identificació de proteïnes diferencialment secretades per cèl·lules tubulars humanes en cultiu sotmeses a diferents noxes en condicions subtòxiques (CsA, FK506, Rapamicina i Staurosporina). La hipòtesi de treball és que, potencialment, aquestes proteïnes podrien ser detectades en sang i orina de pacient trasplantats i ser útils com a biomarcadors primerencs específics de la nefrotoxicitat causada per fàrmacs CNIs

S'han obtingut mapes proteòmics de les proteïnes secretades (secretomes) en cada condició subtòxica i s'han determinat les proteïnes diferencialment secretades en cada cas. Entre les proteïnes específicament secretades per CsA i/o FK-506 hem analitzat la vàlua de dues d'elles com a biomarcador de dany renal per CNIs: Plasminogen activator-inhibitor-1 (PAI-1), diferencialment secretada per CsA, i Fascina-1, secretada per efecte d'ambdós fàrmacs CNIs. La mesura dels nivells de PAI-1 en sang i orina de pacients trasplantats de ronyó no ha resultat ser útil per detectar dany renal per fàrmacs CNIs. En canvi, hem observat que l'aparició de Fascina-1 en orina de pacients trasplantats de ronyó i de pulmó sembla indicar disfunció renal precoç produïda per fàrmacs CNIs. També, hem detectat Fascina-1 en exosomes urinaris de pacients trasplantats de ronyó fet que permet explicar l'aparició d'una proteïna dels citoesquelet al medi extracel·lular. Els resultats obtinguts suggereixen que l'alliberació al medi de Fascina-1 induïda per fàrmacs CNIs és dependent de l'activació de la proteïna quinasa C.

ABREVIATURES

ACE	Enzim convertidor de l'angiotensina	FBS	Fetal Bovine Serum
AKT o PKB	Proteïna quinasa B	FIAT	Fibrosis intersticial i atròfia tubular
ANOVA	Anàlisi de la variància	FKBP	FK-506-Binding Protein
ATP	Adenosina trifosfat	FSCN-1	Fascina-1
ATPasa	ATP sintasa	GFR	Glomerular Filtration Rate
BIP	Binding Immunoglobulin Protein ¹	GRP-78	78 kDa glucose-regulated protein ¹
BUN	Blood Urea Nitrogen	HED	Hydroxiethyl disulfide
CAN	Chronic Allograft Nephropathy	HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
CD	Cluster of Differentiation	HK-2	Línia cel·lular Human Kidney-2
CEIC	Comitè Ètic d'Investigació Clínica	HLA	Human Leukocyte Antigen
CHAPS	3-((3-Cholamidopropyl)dimethylammonium)-1-propanesulfonate	HPV16	Virus del papil·loma humà 16
CKD	Chronic Kidney Disease	IEF	Isoelectroenfoc
CKD-EPI	Chronic Kidney Disease-Epidemiology Collaboration	Ig A	Immunoglobulina A
CNI	Inhibidor de la fosfatasa calcineurina	IGF-I	Insuline-like growth factor I
CNIT	Calcineurin inhibitor toxicity	IL	Interleuquina
CO₂	Diòxid de Carboni	IRA	Insuficiència Renal Aguda
COX	Enzim ciclooxigenasa	IRC	Insuficiència Renal Crònica
CsA	Ciclosporina A	IRT	Insuficiència Renal Terminal
Cyp B	Ciclofilina B	KIM-1	Kidney injury molecule-1
CYP3A	Citocrom 3A	LDH	Lactat deshidrogenasa
CYP3A5	Citocrom 3A5	MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - Time-Of-Flight
DAG	Diacilglicerol	MAPK	Mitogen-activated protein kinase
DIGE	Difference gel electrophoresis	MDR-1	Multidrug Resistance protein-1
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium	MDRD	Modification of Diet in Renal Disease
DNA	Àcid desoxiribonucleic	MFA	Àcid Micofenòlic
DO	Densitat òptica	MHC	Complex major d'histocompatibilitat
DTPA	Diethylenetriamine penta-acetic acid	MMF	Mofetil Micofenolat
DTT	Dithiothreitol	mRNA	RNA missatger
EDTA	Etilendiaminotetraacetat de sodi	mTOR	mammalian target of rapamycin
EGF	Epidermal growth factor	mudPIT	Multidimensional Protein Identification Technology
eGFR	estimated glomerular filtration rate	MVP	Multivesicular bodies
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay	NAD	Nicotinamida adenina dinucleòtid
EMIT	Enzyme Multiplied Immunoassay Technique	NAG	N-acetil-β-(D)-glucosaminidasa
EMT	Epithelial Mesenchymal Transition	NFAT	Nuclear Factor of Activated T Cells
e-NOS	endothelial Nitric Oxide Synthase	NGAL	Neutrophil gelatinase associated lipocalin
ERK	Extracellular signal-regulated kinase	NKCC2	Cotransportador Na ⁺ K ⁺ /2Cl ⁻
ESI-MS/MS	Espectrometria de masses en tàndem	NO	Nitric Oxide
FABP	Fatty Acid Binding Protein	NTA	Necrosi tubular aguda
		p53	Proteïna tumor 53

¹ BIP i GRP-78 són dues nomenclatures per designar la mateixa proteïna.

PAGE	Electroforesi en gel d'acrilamida	SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
PBS	Phosphate Buffered Saline	SELDI-TOF	Surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry
PDGF	Platellet Derived Growth Factor	SEM	Error estandard de la mitjana
PI	Punt isoelèctric	SN	Sobrenedant
PI3K	Phosphatidylinositide 3-kinase	T3	Triiodotironina
PKC	Proteïna quinasa C	TEMED	Tetramethylethylenediamine
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate	TGF-β	Transforming growth factor β
PP2B	Fosfatasa dependent de calci i calmodulina o Calcineurina	TMA	Microangiopatia trombòtica
PVDF	Polyvinylidene fluoride	TSG-101	Tumor susceptibility gene 101
RAH	Rebuig agut humoral	UNOS	United Network for Organ Sharing
RAS	Sistema renina-angiotensina	WB	Western Blot
RCC	Carcinoma Renal de Cèl·lules Clares	WCE	Whole cell extract
RCH	Rebuig crònic humoral	α-SMA	α -smooth muscle actin
RNA	Àcid Ribonucleic	βTP	β -trace protein
ROS	Espècies reactives d'oxigen		
SD	Desviació típica		

INTRODUCCIÓ

1. L'APARELL URINARI

L'aparell urinari es compon d'un conjunt d'estructures que intervenen en la depuració de la sang de substàncies tòxiques, en l'emmagatzematge i en l'evacuació de l'orina. En formen part els ronyons i les vies urinàries. L'orina és elaborada pels ronyons, i emmagatzemada i conduïda cap a l'exterior mitjançant les vies urinàries que es componen per un conjunt de viscères buides. L'orina surt dels ronyons pels urèters (un per cada ronyó) que la condueixen a la bufeta urinària on s'emmagatzema fins a la micció, moment en que la orina es alliberada a l'exterior per un conducte únic, la uretra¹.

2. EL RONYÓ

Els ronyons humans són dues viscères que, en individus adults, tenen una mida aproximada de 11 cm de llargada per 6 d'ample i 3 de gruix i pesen entre 150 i 160 g en homes sent lleugerament menor el pes d'aquests en dones. Es localitzen a la part posterior del peritoneu, al costat de la columna vertebral i es troben envoltats d'abundant teixit fibro-adipós².

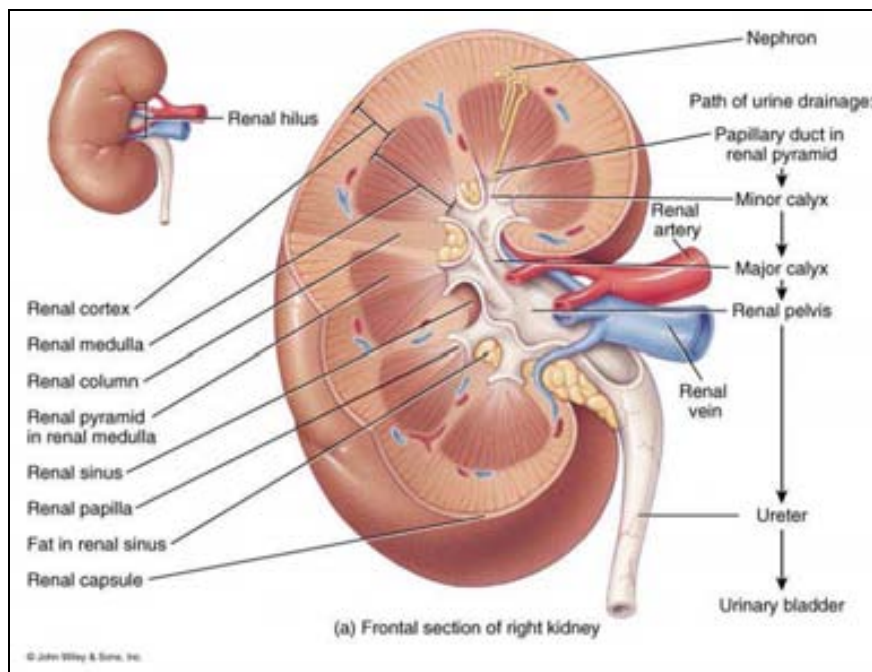


Figura 1. **Anatomia del ronyó dret humà.** En la imatge s'hi poden observar les principals estructures i unitats del ronyó humà.

En un tall hemiseccionat es poden distingir dues parts clarament diferenciables a simple vista: el còrtex i la medul·la renal. El còrtex és la part externa que forma un arc de teixit situat immediatament sota la càpsula conjuntiva i de coloració vermellosa. La part interna és la medul·la, d'aspecte més pàl·lid, està constituïda per 12-18 subdivisions còniques denominades piràmides medul·lars. Cada piràmide està separada de la següent per reparticions notables de substància cortical que penetren a la medul·la amb el nom de columnes renals o de Bertín. La unitat morfo-funcional del ronyó s'anomena lòbul renal, constituïda per una piràmide medul·lar amb la seva porció de còrtex associada (Figura 1).

La principal funció del ronyó és eliminar productes de rebuig del metabolisme i quantitats regulades d'aigua per tal de mantenir la osmolaritat correcta dels fluids corporals mitjançant la producció d'orina³. El ronyó conserva l'aigua i els electròlits presents de forma normal en els fluids de l'organisme, fonamentalment sodi, potassi, clorur i bicarbonat. Alhora, elimina els productes de rebuig derivats del metabolisme (urea, creatinina i ions hidrogen, entre d'altres) i els productes tòxics exògens que hagin pogut penetrar l'organisme (fàrmacs, toxines...). Això és realitzat per dos processos fonamentals: la formació d'un volum gran d'ultrafiltrat de líquid plasmàtic i posteriorment un processat selectiu d'aquest filtrat. D'aquesta forma, es generen al dia 1-2 litres d'orina conservant el 99% de l'aigua filtrada⁴.

Els ronyons reben la sang a través de les artèries renals, que es ramifiquen de la aorta, i retorna a la vena cava per les venes renals. Dins els ronyons, la sang flueix per uns entramats capil·lars complexos anomenats glomèruls que es troben envoltats per una càpsula especialitzada anomenada càpsula de Bowman. L'endoteli d'aquests capil·lars és extremadament fenestrat permetent així el procés de filtració glomerular. Aquest està afavorit pel fet que en aquesta zona la pressió sanguínia es més elevada que en la resta de capil·lars de manera que part de l'aigua i molècules petites dissoltes en el plasma puguin passar a l'espai capsular. L'ultrafiltrat abandona la capsula de Bowman entrant en una estructura anomenada túbul renal. Els túbuls renals mitjançant complexos processos metabòlics, que inclouen la reabsorció selectiva i retorn a la sang de la major part d'aigua i soluts, generen la orina. El producte final, la orina, es recol·lectat en túbuls col·lectors, on drenen varis túbuls de diferents nefrones, que es van unint entre si fins a la pelvis renal que drena

a l'urèter, un conducte que transporta la orina completament formada dels ronyons fins la bufeta urinària³.

El ronyó també és responsable de la síntesi de diverses hormones o precursors (eritropoetina, renina, calcitriol i prostaglandines) que tenen un paper cabdal en la regulació del sistema cardiovascular i en la pròpia funció renal⁴.

2.1. LA NEFRONA

A nivell histològic, la unitat funcional del ronyó és la **nefrona** (Figura 2). En un home adult existeixen entre 1.5 i 2 milions de nefrones repartides per tot el còrtex renal i se'n poden distingir dues parts principals: els glomèruls, situats a la part cortical del ronyó, i el sistema tubular cortico-medul·lar.

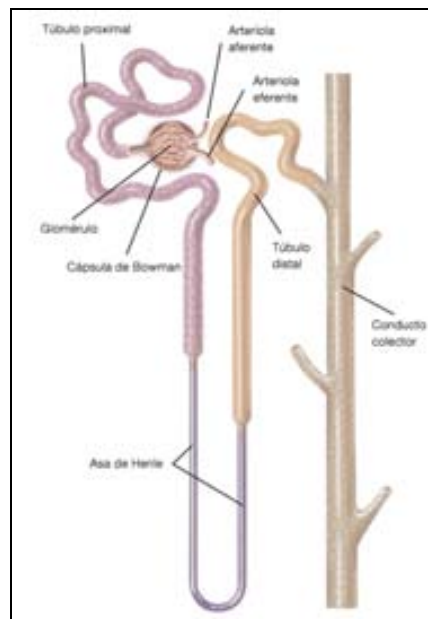


Figura 2. **Estructura de la nefrona.** En la imatge s'hi mostren les parts principals de la nefrona: el glomèrul i les diferents parts de la secció tubular.

El corpuscle renal té forma esfèrica i es compon de 2 pols: on entren i surten els vasos es denomina *pol vascular* i es localitza en la zona oposada al *pol urinari* que connecta amb el túbul proximal.

La part externa del corpuscle renal s'anomena càpsula de Bowman i s'estructura de dues capes: l'epiteli extern o parietal i l'intern o visceral. L'epiteli extern o parietal es compon d'un epiteli pla simple mentre que l'epiteli intern o visceral es compon

per cèl·lules especialitzades anomenades *podòcits*. Es tracta de cèl·lules amb prolongacions, anomenades pedicels, que es troben íntimament adherides als capil·lars glomerulars. L'epiteli visceral juntament amb el cabdell capil·lar glomerular o glomerul constitueixen una estructura altament especialitzada, anomenada *barrera de filtració glomerular*, que permet que la sang que arriba als capil·lars glomerulars sigui ultrafiltrada amb la finalitat d'evitar la pèrdua de proteïnes de més de 60-70 kDa, permetent el pas de proteïnes petites i d'altres molècules. La cavitat entre els 2 epitelis es denomina espai urinari o de Bowman, es troba en continuïtat i obert a la llum del túbul proximal.

La **porció tubular** es divideix en 4 parts que es divideixen al seu torn en diferents segments: túbul proximal, túbul intermedi o nansa de Henle, túbul distal i sistema col·lector.

El túbul proximal constitueix el segment més llarg de la nefrona i s'inicia al pol urinari del corpuscle renal a partir de la transformació de les cèl·lules de la càpsula de Bowman. En els túbuls proximals es dona la reabsorció activa d'aminoàcids, glucosa, fosfats i ions de Cl^- , K^+ i la major part de Na^+ . Per aquesta raó, les cèl·lules epitelials que formen el túbul proximal són metabòlicament molt actives i presenten microvellositats a la membrana apical. Els microvilli formen el *brush border* a la cara luminal permetent incrementar la superfície d'absorció 40 vegades.

El túbul proximal es continua amb la nansa de Henle on es dona la reabsorció passiva d'aigua. Aquest fragment desenvoca al túbul distal. El túbul distal és més curt i prim que el túbul proximal tot i que el diàmetre de la llum és lleugerament major. La funció d'aquesta porció del túbul és la reabsorció passiva d'aigua i activa d'ions Na^+ . El seu epiteli es compon de cèl·lules cúbiques sense *brush border* i amb escassos orgànuls a excepció de la presència de mitocòndries a la part basal amb moltes crestes.

Els túbuls distals drenen als túbuls col·lectors que donen lloc al sistema col·lector. La part inicial del sistema col·lector es dirigeix a la medul·la interna on convergeixen amb túbuls similars anomenats conductes papil·lars de Bellini que es dirigeixen a la uretra.

La funció de cada nefrona és regulada per l'aparell juxtaglomerular. L'aparell juxtaglomerular és una estructura microscòpica situada al costat del glomèrul que regula el flux sanguini, la taxa de filtració glomerular i la pressió arterial a través de la síntesi de la hormona renina.

3. LA INSUFICIÈNCIA RENAL

Es coneix com a insuficiència renal la disminució o pèrdua de la capacitat funcional dels ronyons. Aquesta pèrdua de la funció renal pot ser temporal o permanent i es caracteritza per la reducció del filtrat glomerular i l'augment en sang de productes de rebuig com creatinina o urea. Es pot originar per diverses causes i pot donar lloc a alteracions funcionals a la resta de l'organisme. Sense el tractament adequat pot conduir a la mort.

Atenent al grau de trastorn produït i la seva durada podem distingir dos tipus d'insuficiència renal: Insuficiència Renal Aguda (IRA) i Insuficiència Renal Crònica (IRC). En els casos d'Insuficiència Renal Terminal (IRT) el tractament consisteix en mètodes de substitució de la funció renal com la diàlisi o el trasplantament renal⁵.

3.1. LA INSUFICIÈNCIA RENAL AGUDA

La Insuficiència Renal Aguda (IRA) es caracteritza per un deteriorament sobtat de la funció renal i, en general, és reversible si el pacient respón adequadament al tractament. Segons l'origen, aquest tipus d'insuficiència renal es pot classificar en^{5,6}:

- a. IRA pre-renal: causada per qualsevol trastorn localitzat fora de l'aparell renal que ocasioni disminució del flux sanguini als ronyons i que, per conseqüència, doni lloc a una disminució del filtrat glomerular. Si no es tracta de forma precoç la reducció de flux sanguini als ronyons ocasiona isquèmia local que produeix la disfunció i mort de les cèl·lules renals tubulars produint així IRA renal.
- b. IRA renal o intrínseca: causada per qualsevol disfunció que afecti les cèl·lules renals i alteri la funció de la nefrona. Es dona per lesió tubular aguda (també anomenada necrosi tubular aguda), lesió glomerular o lesió vascular.

- c. IRA postrenal o obstructiva: causada per qualsevol obstrucció de les vies urinàries que impedeixi la evacuació de la orina interrompent el procés de filtrat glomerular.

En països occidentals la incidència de IRA és d'uns 200 casos per milió d'habitants en població adulta i any, sent lleugerament menor en la població infantil. Aquesta disfunció renal s'observa més en homes (66%) que en dones i, tot i que es pot donar a qualsevol edat, és més freqüent en majors de 60 anys⁶.

3.2. LA INSUFICIÈNCIA RENAL CRÒNICA

La Insuficiència Renal Crònica (IRC) es caracteritza per la destrucció de nefrones originant una disfunció renal progressiva, generalment, irreversible i que obliga a seguir un tractament substitutiu de la funció renal de forma permanent.

3.2.1. Causes de la Insuficiència Renal Crònica

Tot i que la majoria de malalties renals poden produir un dany estructural de gravetat suficient per causar una disminució crònica del filtrat glomerular, les causes més comuns de la insuficiència renal crònica són la poliquistosi renal, la nefropatia diabètica, la hipertensió arterial que condueix a nefroangiosclerosi, la nefritis intersticial per analgèsics, les obstruccions urinàries, la glomerulonefritis, la pielonefritis crònica i diverses malalties renals hereditàries⁵. A més existeix un important percentatge de IRC en estat avançat de difícil diagnòstic atribuïda a causa incerta o no filiada⁷. La freqüència de cada una de les causes que condueixen a IRC presenten importants diferències geogràfiques i cronològiques. En països desenvolupats la nefropatia diabètica i la nefroangiosclerosi són les principals causants de IRC però en països amb escassos recursos econòmics i sanitaris, les glomerulonefritis i les malalties renals secundàries ocupen les primeres posicions⁷. Tot i que es coneix que factors socio-sanitaris (sedentarisme, obesitat, dieta occidentalitzada) i genètics (predisposició genètica a la nefroangiosclerosi de pacients afroamericans) tenen un paper destacat en l'evolució de IRC, les raons d'aquestes diferències etiològiques no estan clares⁷. S'accepta a arreu del món que entre 80 i 100 pacients per milió d'habitants i any moren per fracàs renal crònic si no

tenen accés a un programa de tractament actiu com la diàlisi o bé el trasplantament renal.

3.2.2.Evolució de la Insuficiència Renal Crònica

La insuficiència renal crònica evoluciona de forma variable a la insuficiència renal terminal (IRT). L'IRC avança de forma lenta fet que permet que es desenvolupin mecanismes compensadors que permeten que la malaltia progressi sense presentar símptomes durant períodes variables. Al llarg de la seva evolució es poden diferenciar quatre estadis⁸:

- a. Estadi I: en aquest estadi la taxa de filtrat glomerular és superior al 50% respecte al filtrat normal i no es manifesten símptomes (sols els de la malaltia causant).
- b. Estadi II: la taxa de filtrat glomerular és del 40-50% respecte al filtrat normal i s'observa poliúria i increment moderat dels nivells d'urea i creatinina.
- c. Estadi III: la taxa de filtrat glomerular es troba entre un 20 i un 40% del filtrat normal. Es caracteritza per poliúria amb nictúria, increment notable en sang de residus nitrogenats, descens del nivell de calci i fòsfor i altres símptomes d'intensitat variable (astènia, nàusees i vòmits).
- d. Estadi IV: la taxa de filtrat glomerular és inferior al 15% en relació a la situació normal i s'accentuen els símptomes descrits a l'estadi previ. Progressa al coma urèmic irreversible i la mort si no s'apliquen teràpies substitutives (diàlisi o trasplantament).

3.2.3.Mecanismes d'evolució de la Insuficiència Renal Crònica

Una de les característiques més rellevants de l'IRC és la seva tendència a la progressió, que es deu tant a factors específics lligats a la malaltia causal com a una evolució inespecífica, independent de la causa inicial⁷. En aquest sentit, s'han proposat dos models sobre la progressió de l'IRC⁹:

- a. Teoria de la sobrecàrrega o de hiperfiltració: la malaltia renal inicial dona lloc a una disminució de nefrones funcionals. Aquesta reducció produiria una inducció

a la hipertròfia i hiperfiltració de la resta de nefrones que a llarg termini podrien resultar contraproduents per la seva estructura i funció, donant lloc a IRC.

b. Teoria de la fibrosis: suggereix que els insults inicials que rep el ronyó resulten en un dany tubulo-intersticial que induiria inflamació i fibrosis produint finalment IRC.

Les dues teories no són mútuament excloents ja que substàncies vasoactives, com la endotelina, l'angiotensina II, el tromboxà A₂ o les prostaglandines, produeixen, a més dels efectes vasculars, una important potenciació tant dels processos d'hipertròfia/hiperfiltració com de la fibrosis ja que indueixen diversos factors de creixement tals com TGF- β (*transforming growth factor β*), PDGF (*Platlet Derived Growth Factor*), IGF-I (*Insuline-like growth factor I*), entre d'altres. En fisiopatologia renal el més rellevant és el TGF- β que indueix fibrosi alhora que promou la retenció de les cèl·lules de la nefrona en fase G1 del cicle cel·lular mitjançant la inhibició de l'activació de les ciclines E. A més, l'angiotensina II actua també de forma nociva en el progrés del IRC incrementant la síntesi de diverses citocines proinflamatòries que contribueixen a la infiltració intersticial de macròfags i d'altres cèl·lules del sistema immunitari⁷.

D'altres factors també es troben implicats en el desenvolupament d'aquesta patologia com són la proteïnúria, els lípids o la isquèmia renal, que mitjançant diferents mecanismes contribueixen a la fibrosi intersticial acompanyada per inflamació⁷.

4. TRACTAMENTS SUBSTITUTIUS DE LA FUNCIO RENAL

La insuficiència renal crònica (IRC) és actualment la única malaltia on és possible la substitució de la funció d'un òrgan vital de manera que es manté la vida del pacient amb una qualitat de vida i rehabilitació molt acceptables¹⁰. Les teràpies substitutives renals són: mètodes de diàlisi o trasplantament renal. L'any 2011, a l'Estat Espanyol, el nombre de persones sotmeses a diàlisi es xifra en unes 23.600 mentre que unes 24.000 porten un trasplantament renal funcionant¹¹.

4.1. MÈTODES DE DIÀLISI

La diàlisi és un fenomen físic que es basa en posar en contacte dues dissolucions, separades solament per una membrana semipermeable, de manera que es pugui donar un intercanvi de substàncies entre ambdues dissolucions. En medicina s'han desenvolupat mètodes que permeten efectuar una diàlisi entre la sang i una dissolució artificial de forma que es pugui substituir les funcions depuratives i d'ultrafiltració del ronyó. En l'actualitat, s'efectuen dos tipus de diàlisis, la hemodiàlisi on es fa circular la sang del pacient per una membrana artificial amb l'ajuda d'un aparell, i la diàlisi peritoneal, en que la membrana utilitzada és el mateix peritoneu.

Tot i que aquests mètodes han resultat molt eficaços per suplir la funció excretora del ronyó, no aconsegueixen una regulació en el temps com ho fa el ronyó ni supleixen les seves funcions endocrines. Es tracta de tractaments costosos¹⁰, que interfereixen en major o menor grau en les activitats del malalt i generen diverses complicacions clíniques (hipotensió, infeccions, nàusees, vòmits, febre, entre d'altres) i tècniques (coàguls en els tubs, entrada de bombolles d'aire a la circulació sanguínia i pèrdua de sang, entre d'altres)¹²⁻¹⁴.

4.2. EL TRASPLANTAMENT RENAL.

El trasplantament renal ha suposat una millora en la qualitat i la esperança de vida de pacients amb insuficiència renal crònica terminal respecte als pacients sotmesos a mètodes de diàlisi. Segons dades de la Organització Nacional de Trasplantament (ONT) de 2011, Espanya és, a nivell mundial, el país que generà més trasplantaments renals, 53 ronyons trasplantats per milió de població de donant cadàver¹¹.

4.2.1. Procediment quirúrgic i selecció de donants

L'objectiu d'aquest procés quirúrgic és restablir la funció renal el major temps possible i consisteix en la introducció d'un ronyó sa a la cavitat ilíaca del pacient, unint l'artèria i la vena renal de l'empelt amb l'artèria i la vena ilíaca del pacient, respectivament, i connectant, també, l'urèter de l'empelt amb la bufeta urinària del pacient (Figura 3).

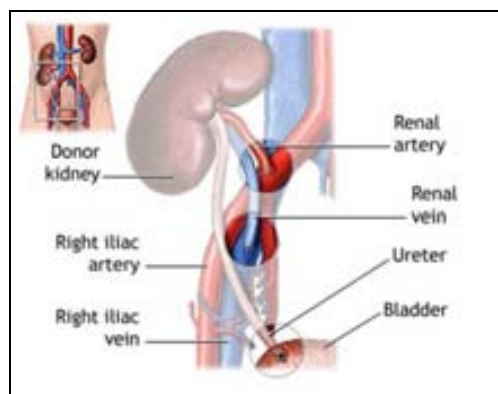


Figura 3. Esquema del procés quirúrgic per realitzar un trasplantament renal.

L'Estat Espanyol és un dels estats líder en nombre de trasplantaments per any gràcies a un sistema de detecció i selecció de possibles donants, i distribució d'òrgans altament coordinat¹⁵⁻¹⁷. Com la resta dels òrgans, els ronyons s'obtenen majoritàriament de pacients que han perdut la funció reguladora cerebral i que per tant es troben en situació de mort encefàlica¹⁸. En alguns casos, també es poden utilitzar òrgans de persones que han patit una aturada cardíaca sobtada sempre que es compleixin una sèrie de condicions^{19,20}. En ambdós casos, les funcions vitals es mantenen artificialment fins al moment de l'extracció dels òrgans. A més, els ronyons, al ser un òrgan parell, també permeten el trasplantament renal a partir del ronyó d'una altra persona, aquest tipus de trasplantament es denomina trasplantament renal a partir d'un òrgan de donant viu²¹. Un cop extrets, els ronyons es conserven en fred en una solució de preservació que disminueix el metabolisme cel·lular amb l'objectiu de frenar el deteriorament del teixit²² i es transporten fins al centre on es realitzarà el trasplantament.

Idealment, els donants s'han de trobar lliures de malalties infeccioses, de transmissió i de càncer i amb bona funció de l'òrgan a trasplantar (criteris recollits en documents de consens de la *Organització Nacional de Trasplantament* per cada una de les especialitats^{23,24}).

Pel que fa a trasplantament renal, a part de tenir en compte els criteris estàndard de selecció de donants, idealment no haurien de tenir antecedents d'hipertensió arterial ni diabetis *mellitus* ja que són factors que predisposen a la insuficiència renal i que poden haver afectat el ronyó²⁵. Tot i això, molts donants han presentat

aquestes patologies alguna vegada, pel que s'avalua mitjançant un anàlisi histopatològic de l'empelt renal el grau d'afectació que han pogut causar. L'edat no és un factor limitant per ser donant de ronyó²⁶ tot i que la supervivència a llarg termini de l'empelt és major si el donant és jove^{25,27}.

Per tal d'evitar un rebuig hiperagut, un cop seleccionats els possibles donants es busca el receptor més compatible amb el donant mitjançant la determinació del fenotip HLA (A, B o DR), el grup sanguini (ABO) i la detecció d'anticossos circulants preformats anti-HLA i contra altres proteïnes del donant mitjançant assajos de *crossmatch*²⁵.

4.2.2. Fàrmacs immunosupressors

Un cop s'ha seleccionat el receptor adequat, el pacient es sotmet a un tractament immunosupressor per tal de prevenir el rebuig de l'empelt, sempre en uns rangs idonis per evitar infeccions i l'aparició de neoplàsies relacionades amb una sobreimmunosupressió. Existeixen diferents immunosupressors que actuen sobre diferents dianes inhibint la resposta immunitària que genera l'hoste cap a l'empelt, des de la inhibició de la proliferació cel·lular fins al bloqueig dels senyals coestimuladors necessaris per la correcta activació dels limfòcits T i B²⁸. Al llarg del temps s'han anat incorporant i millorant les teràpies immunosupressores (figura 4) per tal d'obtenir uns resultats adequats que actualment se situen en menys d'un 5% de rebuig a l'any de trasplantament.

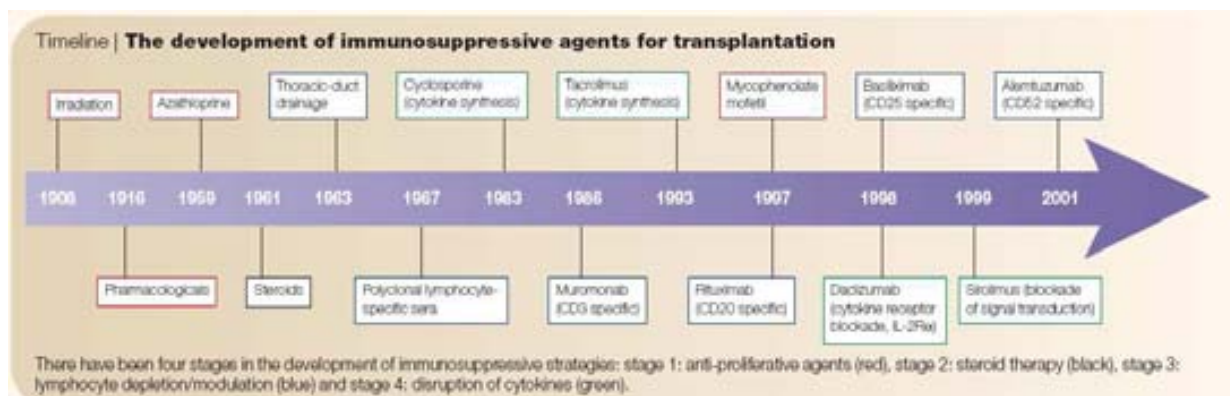


Figura 4. **Descobriment i incorporació a la pràctica clínica dels principals fàrmacs immunosupressors** (Extret de Kahan B.D. 2003²⁹).

Les **teràpies anti-proliferatives** van ser la primera estratègia immunosupressora utilitzada en trasplantament d'òrgans sòlids. El primer fàrmac que es va desenvolupar amb el que es van obtenir una millora de la supervivència de l'empelt renal a l'any va ser l'azatioprina. L'**azatioprina** és un anàleg de la 6-mercaptipurina que inhibeix la síntesi de purines i, conseqüentment, la síntesi de DNA i RNA impedit la divisió cel·lular i la presentació d'antígens. L'ús d'aquest fàrmac es va associar a una incidència del 80% d'episodis de rebuig agut probablement per la metabolització diferencial del fàrmac entre pacients³⁰ i com principal efecte secundari presenta supressió de la hematopoesi produint-se leucopènia i trombocitopènia. Per aquest motiu, el seu ús requereix modulació de la dosi al llarg del tractament³¹. Els fàrmacs anti-proliferatius més moderns, com el **Mofetil Micofenolat (MMF)** o el Micofenolat Sòdic, s'absorbeixen i s'hidrolitzen ràpidament donant lloc al seu compost actiu, l'àcid micofenòlic (MFA). A través de la inhibició de la inosín-monofosfat deshidrogenasa, MFA bloqueja la síntesi *de novo* de purines i selectivament interfereix en la resposta proliferativa dels limfòcits T i B. Els derivats de l'àcid micofenòlic (MFA) presenten efectes més potents i selectius que l'azatioprina tot i que, en el període post-trasplantament immediat, presenten importats diferències entre pacients pel que fa a la farmacocinètica, fet que dificulta la seva estabilització²⁹. Els derivats del MFA s'utilitzen complementàriament amb altres fàrmacs immunosupressors ja que administrats individualment molts òrgans són rebutjats.

A la dècada dels 60, es van introduir els **glucocorticoides**, prednisona i metilprednisona, en la terapèutica immunosupressora combinats amb azatioprina mostrant una supervivència de l'empelt renal a l'any al voltant d'un 60%. Els glucocorticoides inhibeixen la resposta inflamatòria mediada per cèl·lules (hipersensibilitat retardada). El major efecte el produeixen sobre el sistema monocits-macròfags impedit l'alliberació de les interleuquines IL-6 i IL-1. Fins i tot en casos d'èxit, els glucocorticoides són una estratègia complicada ja que eliminen les cèl·lules hematopoètiques del moll de l'ós, provoquen problemes gastrointestinals i generen predisposició a patir infeccions oportunistes²⁹. Actualment s'utilitzen combinats amb d'altres fàrmacs immunosupressors i, pels efectes secundaris esmentats, es retiren poc després del trasplantament.

Durant la mateixa dècada es demostrà la rellevància de la resposta limfocitària en la resposta immunològica cap a l'empelt pel que es van provar diferents **estratègies de depleció de limfòcits**. Inicialment, es van dur a terme drenatges mitjançant una fístula toràcica seguit d'extracció de limfòcits *ex vivo* i retorn del sèrum tractat al sistema venós^{32,33}. Aquest mètode no va ser utilitzat àmpliament a la pràctica mèdica per la complexitat del sistema, i per tal d'evitar el drenatge limfocitari, en la mateixa època, es van començar a administrar sèrums policlonals antilimfocitàris. Aquests sèrums desenvolupats en cavall o conill, contenien anticossos específics anti-CD2, CD3, CD4, CD8, CD25 i CD45 i regions diverses de les molècules HLA i MHC classe I que permeten l'eliminació de plaquetes, cèl·lules limfoides i polimorfonucleades²⁹. Tot i el seu gran potencial, no van arribar a ser utilitzats de forma rutinària per la elevada toxicitat que van presentar en humans. En aquest sentit s'han desenvolupat d'altres aproximacions utilitzant anticossos monoclonals contra cèl·lules del sistema immunològic. L'alemtuzumab o Campath-1H és un anticòs monoclonal humanitzat específic contra CD52 que s'expressa en tots els limfòcits T i B, la majoria de monòcits, macròfags, eosinòfils, cèl·lules NK i cèl·lules dendrítiques. Malauradament aquesta molècula també s'expressa en cèl·lules de la pell i en algunes cèl·lules sistema reproductiu masculí. Per tal d'evitar la reactivitat creuada, s'han utilitzat anticossos monoclonals específics per bloquejar o modular limfòcits T²⁹:

a. OKT3: anticòs murí monoclonal anti-CD3 que s'expressa en tots els limfòcits T madurs. Ha resultat un avanç important en la teràpia immunosupressora i per al tractament d'episodis de rebuig.

b. Anticossos monoclonals contra CD25: la molècula CD-25 s'expressa en els limfòcits T un cop s'ha donat l'estímul antigènic i forma part del receptor de IL-2. Se'n comercialitzen dos de diferents, un quimèric humà-murí, el basiliximab, i un d'humanitzat, el daclizumab. Aquests fàrmacs han resultat poc potents ja que no bloquegen la senyal d'altres citoquines rellevants per la resposta immunològica, perquè competeixen pobrament amb l'IL-2 i perquè podrien impedir l'apoptosi de cèl·lules T mediada per IL-2 o la generació de cèl·lules T reguladores CD25⁺.

En la pràctica clínica només s'utilitzen teràpies amb anticossos, poli o monoclonals, durant períodes curts i en dosis limitades per evitar infeccions virals i/o neoplàsies derivades del seu ús. A més, la utilització prolongada d'aquest tipus d'immunosupressors pot produir al·lèrgies o reaccions neutralitzants del pacient cap a pèptids d'origen animal.

Als anys 80, s'introduí a la pràctica clínica la Ciclosporina A (CsA), fet que va suposar una millora substancial en l'èxit dels trasplantaments situant la supervivència de l'empelt a l'any en un 80%. La CsA juntament amb el FK-506 (tacrolimus), pertanyen a un grup de fàrmacs immunosupressors denominats **anticalcineurínics** (CNI), per la seva capacitat d'inhibir la fosfatasa dependent de calci i calmodulina calcineurina (PP2B). La inhibició de la calcineurina evita la fosforilació i posterior translocació al nucli del factor de transcripció NFAT i, per tant, la conseqüent activació de la transcripció de gens crítics en la resposta immune com ara IL-2 i altres citokines proinflamatòries³⁴. Tant la CsA com l'FK506, exerceixen la seva acció immunosupressora mitjançant la unió als seus receptors intracel·lulars, les immunofilines (figura 5). Les immunofilines són una superfamília de proteïnes altament conservades que es caracteritzen per la seva capacitat de catalitzar la isomerització cis/trans de les unions peptidil-prolil sense ruptura de la cadena peptídica ni formació d'enllaços covalents³⁵. Les immunofilines es classifiquen en tres grups en base al fàrmac al que s'uneixen. Les ciclofilines s'uneixen selectivament a la CsA, les *FK-506 binding proteins* (FKBPs), s'uneixen a FK506 i a rapamicina amb elevada afinitat i les parvulines s'uneixen a la juglona (5-hidroxi-1,4-naftoquinona)³⁵.

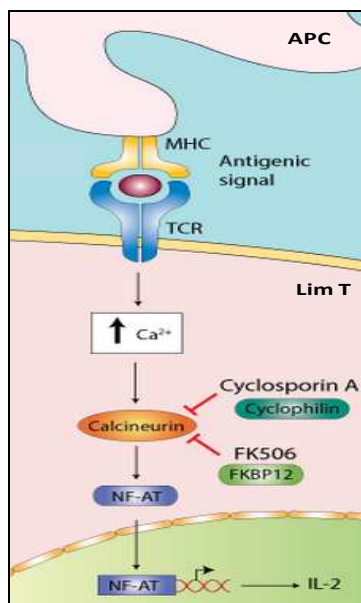


Figura 5. **Esquema de la síntesi de IL-2 depenent de l'activació de la calcineurina i mecanisme d'acció dels fàrmacs anticalcineurínics.** La expressió de la Interleucina-2 (IL-2) en els limfòcits T depèn de l'activació de la fosfatasa calcineurina. La calcineurina defosforila el factor de transcripció NFAT fet que permet la seva translocació al nucli i l'activació de la transcripció del gen de IL-2, entre d'altres. La CsA i l'FK-506 s'uneixen als seus receptors intracel·lulars, les immunofilines ciclofilines i FKBP, respectivament. El complex immunofilina-fàrmac inhibeix l'activitat fosfatasa de la calcineurina. Per tant, el factor de transcripció NFAT no es defosforila i IL-2 no s'expressa. D'aquesta forma, els fàrmacs CNI impedeixen l'activació correcta dels limfòcits T.

El tacrolimus o FK-506 es va introduir a la pràctica clínica posteriorment a la CsA i té un efecte 50 vegades més potent que la CsA. L'acció d'ambdós fàrmacs és específica sobre el llinatge limfoide amb efectes mínims sobre el llinatge mieloide fet que representa el principal avantatge respecte als bloquejadors de la proliferació cel·lular. Tot i això, cap dels dos es pot administrar en dosis prou elevades per evitar el rebuig completament ja que la calcineurina s'expressa en diversos teixits, i la seva inhibició produeix un efecte advers sobre cèl·lules no limfoides²⁹. El principal efecte secundari dels fàrmacs anticalcineurínics és la nefrotoxicitat³⁶⁻³⁸ tot i que també ocasionen neurotoxicitat^{39,40}, hipertensió (sobretot per l'ús de CsA) i diabetes *mellitus* (fonamentalment per efecte de FK-506)⁴¹, entre d'altres²⁹.

El fàrmac més recentment introduït en l'àrea dels trasplantaments és la **rapamicina** o sirolimus. Estructuralment, la rapamicina és similar al tacrolimus però sense la capacitat d'inhibir la calcineurina. La rapamicina inhibeix mTOR (*mammalian target of rapamycin*) una quinasa fonamental en l'aturada en fase G1 dels limfòcits produïda per senyals coactivadores i citoquines. Malauradament, la distribució tissular de la quinasa mTOR és àmplia i l'administració d'aquest fàrmac

produeix també diversos efectes secundaris⁴². A més a més, l'efecte immunosupressor del inhibidor de mTOR també és menys específic que el dels fàrmacs anticalcineurínics²⁹.

Donat que la major part de les teràpies immunosupressores que s'han desenvolupat dirigides a impedir l'activació dels limfòcits T presenten diversos efectes secundaris, són costoses i no presenten una eficàcia uniforme, s'han fet esforços per trobar agents amb capacitat immunosupressora que inhibeixin selectivament la resposta immunològica mediada per cèl·lules B. En aquest sentit, durant la última dècada s'han testat anticossos contra CD-20 (Rituximab), que s'expressa en limfòcits pre-B i madurs, en trastorns limfoproliferatius post-transplant, en casos de rebuig humoral i en trasplantaments ABO no compatibles, amb resultats prometedors^{43,44}.

Actualment, per tal de millorar les teràpies immunosupressores s'estan investigant diferents aproximacions: refinament de les estratègies de depleció de limfòcits, inhibició de la migració dels limfòcits al teixit diana i supressió de les senyals coestimuladores de l'activació de limfòcits, entre d'altres²⁹.

4.2.3. Terapèutica immunosupressora

Gràcies al gran ventall d'immunosupressors existents, la pauta immunosupressora es pot modular generant diferents combinacions i adaptant-la a la situació clínica de cada pacient. Tot i això, els anticalcineurínics (CNI), encara que presenten nefrotoxicitat com a principal efecte secundari, segueixen sent la pedra angular en el tractament immunosupressor. Per tal de minimitzar els efectes nefrotòxics mantenint la capacitat immunosupressora dels fàrmacs s'han realitzat nombrosos assajos clínics utilitzant protocols d'immunosupressió basats en CNI combinats amb glucocorticoides i immunosupressors antiproliferatius com el Mofetil Micoferolat (MMF), azatioprina o el sirolimus (rapamicina), entre d'altres⁴⁵.

A la pràctica, les pautes d'immunosupressió segueixen dos fases: inducció i manteniment. Durant la primera setmana post-trasplantament, per assentar la immunosupressió, es sotmet al pacient a un règim immunosupressor potent amb anticalcineurínics (en general tacròlimus) a una dosi elevada i ocasionalment

s'afegeix un anticòs anti-IL2R. Posteriorment, es segueix un tractament de manteniment amb MMF, prednisona i tacròlimus. Els fàrmacs i les dosis es van ajustant en funció del perfil del pacient. Nombrosos assajos han demostrat que aquesta combinatòria és la millor per prevenir el rebuig de l'empelt renal, maximitzant-ne la funció i la vida del nou òrgan⁴⁶.

5. LA NEFROPATÍA CRÓNICA DE L'EMPELT

Les millores en el tractament immunosupressor i quirúrgiques han aconseguit supervivències de l'empelt a l'any al voltant del 90%. Tot i això, després del primer any la majoria dels pacients mostren una pèrdua de la funció renal progressiva denominada nefropatia crònica de l'empelt (**CAN**, *chronic allograft nephropathy*)^{47,48} que junt amb la mort del pacient són les principals causes de pèrdua de l'empelt (Figura 6).

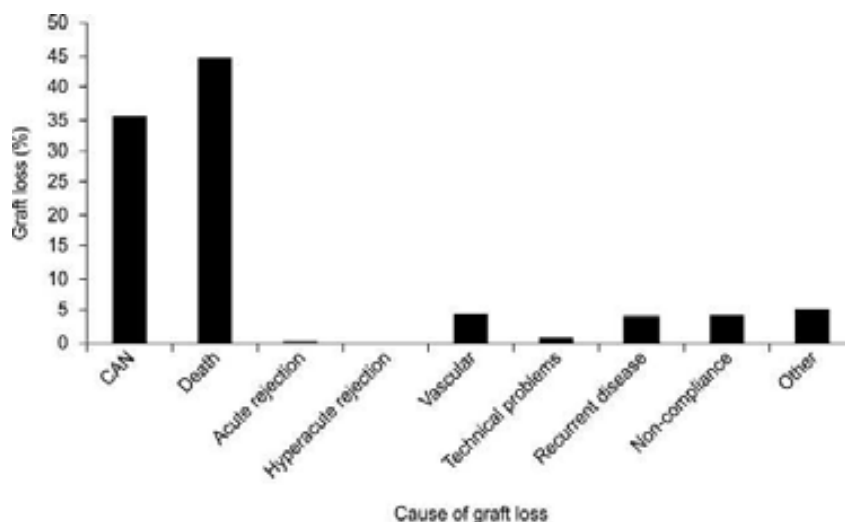


Figura 6. Causes de pèrdua de l'empelt renal (Extret de Serón *et al.* 2008⁴⁹).

S'estima que a l'any de trasplantament un 25% dels pacients portadors d'un empelt renal presenten CAN mentre que als deu anys de trasplantament aquesta xifra s'eleva a 89%⁵⁰. Clínicament, es caracteritza per una disminució gradual del filtrat glomerular que sovint, es presenta amb diferents graus de proteïnúria i hipertensió arterial⁴⁷. Histològicament, s'associa amb fibrosi intersticial i atrofia tubular (FIAT) tot i que també es pot donar per rebuig subclínic o per glomerulopatia

del trasplantament. Per tant, la etiologia d'aquesta pèrdua de funció renal no és única, raó per qual la nomenclatura CAN s'utilitza per descriure un síndrome clínic consistent en els canvis histològics esmentats seguit d'una pèrdua de la funció renal.

Es creu, que la fibrosi intersticial observada en les biòpsies del primer any post-trasplantament porta a una glomeruloesclerosi causant la disfunció de l'empelt. Tot i això, s'ha observat que el FIAT i la glomeruloesclerosi es poden presentar independentment l'una de l'altra per efecte d'altres factors que poden col·laborar al dany de l'empelt⁴⁹. Actualment hi ha diverses teories per explicar com un dany glomerular i la fibrosi intersticial poden portar a la destrucció de nefrones⁵¹.

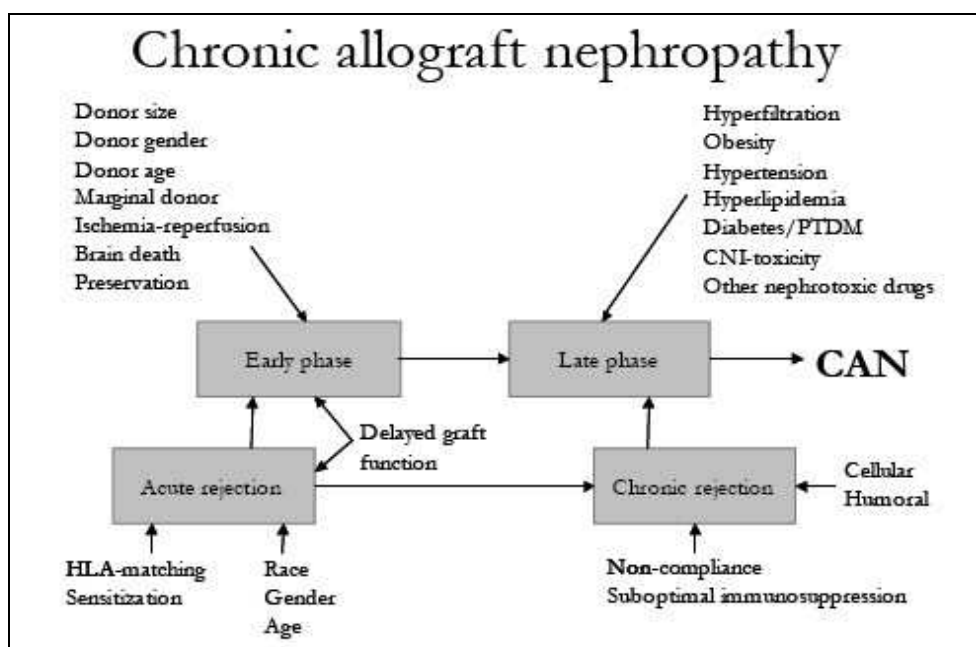


Figura 7. Esquema dels factors que intervien en la progressió de CAN (Extret de Boots J.M.M. 2006⁵²).

La patogènia de la nefropatia crònica de l'empelt amb FIAT és poc clara ja que diferents factors col·laboren en el seu desenvolupament. Es creu que es dona fonamentalment per factors immunològics. Processos de rebuig de l'empelt, ja siguin aguts, subclínic o mediats per anticossos, tenen un paper principal en la progressió de la nefropatia crònica de l'empelt. Per altra banda, no es pot descartar la participació de factors no immunològics. L'edat del pacient, el període d'isquèmia freda previ al trasplantament, comorbiditats associades del donant i del receptor (obesitat, hipertensió arterial, diabetis mellitus, dislipidemia...) i la nefrotoxicitat per

fàrmacs anticalcineurínics també influeixen en la seva evolució (Figura 7). S'ha descrit que CsA i FK506 exerceixen el seu efecte tòxic sobre el ronyó per mecanismes que inclouen canvis aguts en la hemodinàmica renal seguits de fibrosi intersticial irreversible i toxicitat directa sobre les cèl·lules del túbul proximal^{38,53}. En aquest sentit, el tractament immunosupressor podria ser una causa potencial important que podria tenir un paper en la progressió de CAN junt amb d'altres insults que pot patir l'empelt com la isquèmia freda (on els efectes de la isquèmia es veuen agreujats per la hipotèrmia que pateix l'òrgan) i posterior reperfusió que es produeix en els casos de donant cadàver, entre d'altres. S'ha demostrat per anàlisi de dades de la UNOS (*United Network for Organ Sharing*) que ronyons sotmesos a llargs períodes d'isquèmia freda tenen pitjor funció renal després del trasplantament, limitant la supervivència de l'empelt⁵⁴.

Des d'inicis dels anys 90, s'han fet grans esforços per classificar aquest síndrome en categories per tal d'estandarditzar els criteris de diagnòstic de la patologia del ronyó trasplantat⁵⁵. A partir de biòpsies del teixit renal, la nefropatia crònica de l'empelt es pot classificar en diferents categories segons les característiques histològiques establertes en les conferències de Banff de patologia de l'empelt. Seguint aquests criteris, es pot avaluar el tipus dany a nivell histològic que s'està produint a l'empelt, ja sigui per fenòmens de rebuig immunològic (tant canvis mediats per anticossos com per cèl·lules T) o per fenòmens de causa desconeguda (patró histològic de FIAT sense infiltració de cèl·lules immunitàries ni anticossos anti-HLA circulants), i establir el grau de lesió que presenta l'òrgan trasplantat^{56,57}. El sistema de classificació de Banff té un seguit de limitacions. En primer lloc, la valoració de les lesions és semiquantitativa. Això, genera certa variabilitat dins dels mateixos centres i entre ells. En segon lloc, la existència de categories poc clares, com la *borderline* o FIAT, que no permeten obtenir un diagnòstic precís. En aquest sentit, s'està treballant per poder afegir la determinació de canvis moleculars a les categories diagnòstiques existents per tal de millorar la classificació actual⁵⁵.

6. NEFROTOXICITAT PER FÀRMACS ANTICALCINEURÍNICS

Els fàrmacs immunosupressors inhibidors de la calcineurina, CsA i FK-506, són un factor de risc a considerar en el desenvolupament de la nefropatia crònica de l'empelt (CAN) ja que presenten nefrotoxicitat com a principal efecte secundari.

Un 94% dels pacients trasplantats de ronyó estan sotmesos a un règim immunosupressor de manteniment basat en fàrmacs anticalcineurínics (CNI), majoritàriament tacròlimus³⁸. En un estudi prospectiu on es van valorar les lesions existents en biòpsies seriades d'empelts renals, es va observar que un 76% dels pacients trasplantats de ronyó mostraven signes de nefrotoxicitat per anticalcineurínics a l'any, i un 97% als 10 anys post-trasplantament⁵⁰. Tot i aquestes dades, cal dir que en biòpsies d'empelt renal, les lesions produïdes per fàrmacs CNI són difícils de diferenciar de les produïdes per altres factors. Aquest fet produeix que el dany real produït per CNI pugui estar sobreestimat en pacients trasplantats de ronyó. Dades obtingudes de pacients trasplantats d'altres òrgans sòlids indiquen que entre un 20 i un 50% dels portadors d'un cor trasplantat, un 18% dels pacients trasplantats de cor i de pulmó i entre un 18 i un 56% de portadors d'un empelt hepàtic van patir insuficiència renal crònica a l'any de trasplantament. Aquesta insuficiència renal crònica esdevé terminal en un 5-10% dels pacients als 10 anys post-trasplantament. Tot i la variabilitat entre les dades, en la majoria d'aquests estudis s'identificà el règim immunosupressor basat en CNIs com un dels factors més preponderants en la pèrdua de la funció renal ja que en molts casos si es reduïa la dosi de CNI o s'interrompia el tractament, el filtrat glomerular millorava^{58,59}.

6.1. PATOGENIA I LESIONS HISTOLÒGIQUES ASSOCIADES A LA NEFROTOXICITAT PER CNIS

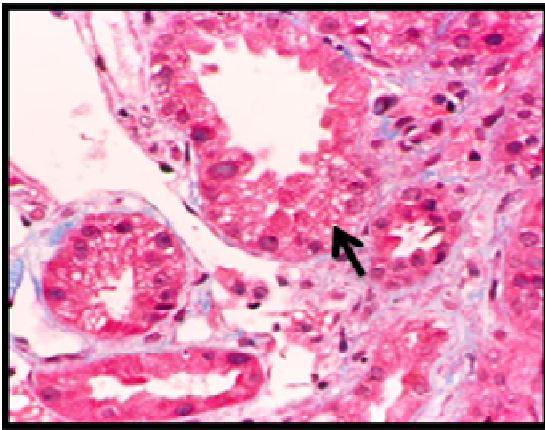
L'ús de fàrmacs anticalcineurínics s'ha associat a un descens de la taxa de filtració glomerular acompanyat per increment de la pressió arterial. La toxicitat renal per fàrmacs CNI es pot presentar de **forma aguda** si els canvis són tan sols funcionals, i per tant, reversibles si es redueix la exposició als fàrmacs CNIs. S'ha observat, però, que l'administració continuada d'aquests fàrmacs pot conduir a una

pèrdua de la funció renal irreversible resultat d'un dany tubulo-intersticial i glomerular progressiu, ocasionant **nefrotoxicitat crònica per anticalcineurínics**.

A nivell histològic, la nefrotoxicitat aguda es caracteritza per arteriopatia aguda (sense alteracions histològiques), vacuolització tubular isomètrica i microangiopatia trombòtica (TMA)³⁸ (Veure Figura 8). La TMA és una lesió de la paret dels vasos sanguinis (principalment arterioles o capilars) amb engruiximent parietal, trombosis plaquetària intraluminal i obstrucció parcial o completa de la llum vascular⁶⁰.

Lesions histològiques associades a la nefrotoxicitat aguda per CNIs

Vacuolització isomètrica



TMA

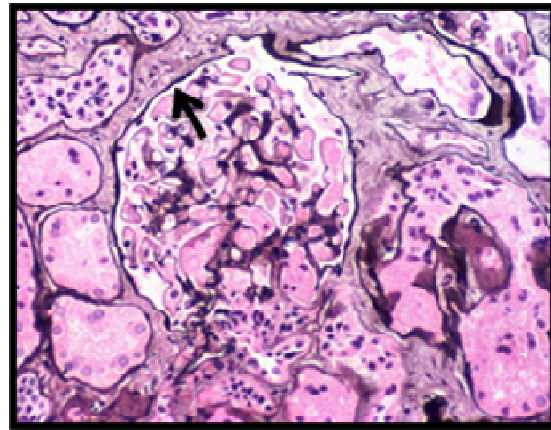


Figura 8. **Lesions histològiques associades a la nefrotoxicitat aguda per fàrmacs anticalcineurínics**. Els CNIs típicament causen vacuolització isomètrica a les cèl·lules del túbul i microangiopatia trombòtica (TMA). Imatges extretes dels atles histopatològics: “*Transplant Pathology Internet Services (TPIS)*” i “*Atlas of Renal Pathology*”^{61,62}.

Quan la nefrotoxicitat esdevé crònica, histològicament s'observa fibrosi intersticial (amb un patró en bandes o “*striped*”, fibrosi localitzada preferentment a nivell dels radis medul·lars), atròfia tubular (pèrdua del *brush border* i túbuls acèl·lulars) i hialinosi arteriolar (deposició d'una substància hialina a les parets arteriolar) (veure Figura 9). També es pot observar fibrosi a la càpsula glomerular, glomeruloesclerosi global i/o segmental i focal, hiperplàsia de l'aparell juxtaglomerular i microcalcificacions tubulars.

Lesions histològiques associades a la nefrotoxicitat crònica per CNIs

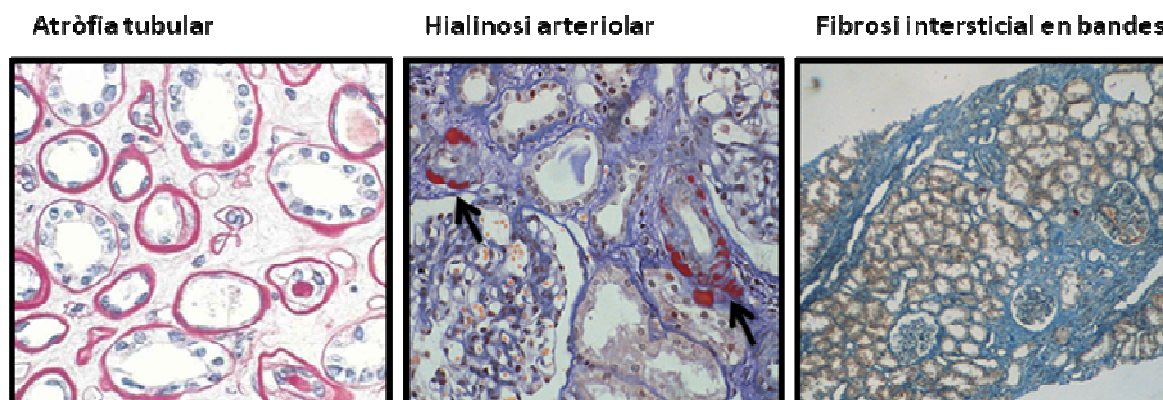


Figura 9. **Lesions histològiques associades a la nefrotoxicitat crònica per fàrmacs anticalcineurínics.** L'administració continuada de CNIs pot produir nefrotoxicitat crònica que histològicament es caracteritza per atròfia tubular, hialinosi arteriolar i fibrosi intersticial en bandes o "striped". Imatges extretes de l'atlas histopatològic "*Histopathological Atlas of Renal Diseases*"⁶³.

Tot i que les lesions histopatològiques esmentades s'han atribuït a l'ús de fàrmacs anticalcineurínics en trasplantats renals, no són específiques per aquest tipus de dany sinó que també apareixen per altres factors. Els efectes aguts també es manifesten per l'ús d'altres fàrmacs, per dany per isquèmia-reperfusió i per recurrència de malalties primàries, i els crònics es troben fomentats a més, per l'edat del donant, lesions pre-existents del donant i hipertensió arterial, entre d'altres³⁸. Aquest fet dificulta la detecció i diferenciació específica d'aquest tipus de dany.

Paral·lelament a les lesions histològiques, els fàrmacs anticalcineurínics produeixen alteracions metabòliques tals com hiperuricèmia, hiperglicèmia i hipertensió, i alteren la funció tubular generant desequilibris en la homeòstasi d'ions tals com hipercalèmia, hiperpotasèmia, hipomagnesèmia i acidosis metabòlica hiperclorèmica (acidosis del túbul distal)^{38,45}. La CsA i l'FK-506 afecten l'activitat de diversos transportadors d'ions, com el cotransportador $\text{Na}^+\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ (NKCC2) de les cèl·lules tubulars, la Na^+/K^+ ATPasa dels conductes col·lectors o el canal de K^+ sensible a ATP. El mecanisme molecular d'aquestes alteracions en el metabolisme d'ions segueix sent una incògnita³⁸.

6.2. MECANISMES DE NEFROTOXICITAT DELS CNIS

La CsA i l'FK-506 generen dany a tots els compartiments renals: vascular, glomèrular i tubulo-intersticial (Figura 10). Els mecanismes pels quals els fàrmacs anticalcineurínics indueixen nefrotoxicitat no està aclarida del tot. Tot i que el desenvolupament del dany agut difereix del dany crònic (detallats en els apartats que segueixen), ambdós tipus es desencadenen fonamentalment per un fort efecte vasoconstrictor sobre les arterioles aferents i per alteracions a nivell de les cèl·lules epitelials tubulars³⁸.

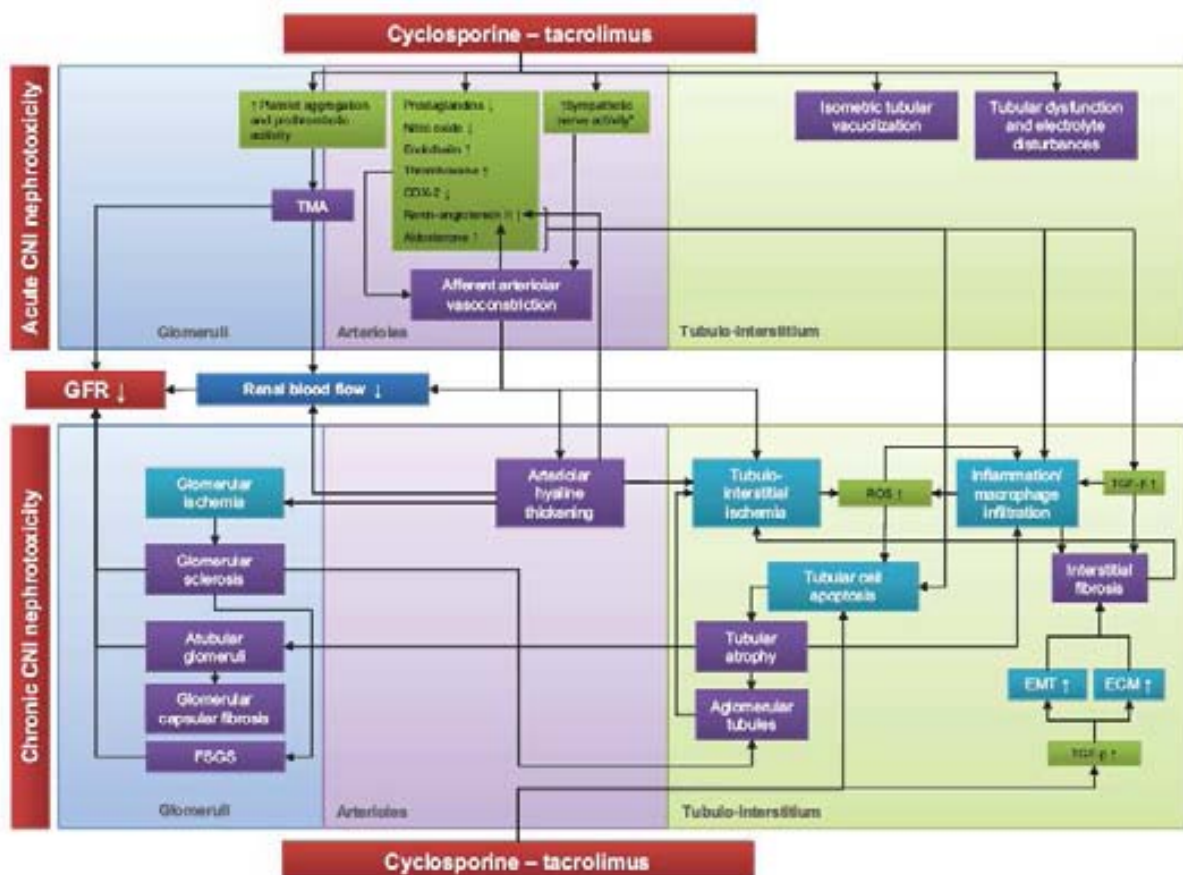


Figura 10. Representació esquemàtica de la etiologia de la nefrotoxicitat per fàrmacs anticalcineurínics (Extret de Naesens *et al.*, 2009³⁸).

La CsA i l'FK-506 difereixen en estructura i en alguns dels efectes secundaris generals però, els seus efectes nefrotòxics són similars i generen les mateixes lesions histològiques⁴⁵. Encara que les dades entre diferents estudis són contradictòries, sembla que l'FK-506 té un efecte nefrotòxic una mica inferior a la CsA³⁸.

S'ha demostrat que modificacions químiques de la molècula de CsA que eliminen la seva toxicitat també resulten en la pèrdua de la capacitat immunosupressora, fet que suggereix que les dues accions es podrien produir per mecanismes comuns com la inhibició de la calcineurina^{38,64}, tot i això, no es poden excloure altres mecanismes. S'ha descrit que les immunofilines (llogands intracel·lulars de CsA i FK-506) es troben implicades en el plegament i transport proteic, en el trànsit de proteïnes⁶⁵ i en la regulació transcripcional⁶⁶, suggerint que el complex immunofilina-fàrmac podria interferir en processos moleculars i cel·lulars rellevants per la funció renal ocasionant nefrotoxicitat independent de la inhibició de la calcineurina.

6.2.1. Mecanismes de nefrotoxicitat aguda

Tant la CsA com l'FK-506, produeixen un fort efecte vasoconstrictor sobre les arterioles aferents ja que generen un desequilibri entre factors vasoconstrictors i els vasodilatadors derivats de l'àcid araquidònic. Els CNIs promouen l'increment de factors vasoconstrictors, com l'endotelina, el tromboxà i l'activació del sistema renina-angiotensina (RAS), alhora que disminueixen els nivells de factors vasodilatadors, entre ells, la prostaglandina E2 i l'òxid nítric (NO). S'han identificat diversos mecanismes que podrien explicar perquè els CNI produeixen vasoconstricció³⁸:

- a. Inhibició de l'activitat de l'enzim ciclooxigenasa-2 (COX-2)⁶⁷. L'enzim COX-2 participa en la síntesi de les prostaglandines i la seva expressió es regulada per NFAT. Per tant, la inhibició de la calcineurina produeix un descens dels nivells COX-2, produint així vasoconstricció i disminució del filtrat glomerular.
- b. Els CNI produeixen estrès oxidatiu i un increment de radicals lliures d'oxigen (ROS) que disminueixen la biodisponibilitat de l'òxid nítric (NO) per oxidació

d'aquest. A més, inhibeixen la síntesi de NO depenent de e-NOS (*endothelial Nitric Oxide Synthase*) per diversos mecanismes. La inhibició de l'acció del NO impedeix la correcta vasodilatació dels endotelis.

c. Activació del sistema RAS, per acció directa sobre les cèl·lules juxtaglomerulars i indirectament per l'efecte hemodinàmic que generen.

d. Estimulació de l'activitat del nervi simpàtic produint resistència vascular. Aquest efecte no s'observa en ronyons trasplantats ja que són innervats.

La microangiopatia trombòtica (TMA) *de novo* post-transplantament induïda per CNIs es dona pel dany endotelial produït per vasoconstricció, tot i que també s'ha descrit que la CsA i l'FK-506 podrien incrementar l'agregació plaquetària activant així factors protrombòtics⁶⁸.

A nivell tubular, els fàrmacs anticalcineurínics s'han associat a l'aparició de vacuolització isomètrica al citosol de les cèl·lules tubulars (figura 8), resultat de la dilatació del reticle endoplasmàtic i increment de la mida dels lisosomes. Aquesta vacuolització es pot trobar en absència de disfunció renal i un estudi recent ha demostrat que no s'associa a la progressió cap al dany crònic per CNIs⁶⁹. Sovint, juntament amb la vacuolització isomètrica, s'han observat cossos d'inclusió formats per mitocòndries gegants i autolisosomes. L'efecte sobre les cèl·lules tubulars es podria explicar com a secundari a l'efecte vasoconstrictor de les arterioles aferents, tot i que no es pot excloure un efecte directe d'aquests fàrmacs sobre les cèl·lules tubulars dependents o no de la inhibició de la calcineurina³⁸.

6.2.2. Mecanismes de nefrotoxicitat crònica

La fase crònica del dany per fàrmacs anticalcineurínics ha estat questionada per diferents autors, generant certa controvèrsia. Aquests autors es basen en que el fet que protocols d'immunosupressió lliures de CNI no han mostrat milloria en quant a la funció renal respecte als basats en CNIs. També argumenten que existeixen altres causes que podrien explicar les lesions observades i, de fet, la majoria dels pacients trasplantats d'altres òrgans tenen funció renal estable als 2 anys post-trasplantament⁷⁰. Tot i això, en general, la nefrotoxicitat crònica és considerada un dels factors limitants dels règims immunosupressors utilitzats^{71,72}.

Estudis histològics han mostrat que el tractament amb CsA i l'FK-506 produeix danys irreversibles a tots els compartiments: vascular (hialinosi arteriolar), tubulo-intersticial (atròfia tubular i fibrosi intersticial) i glomerular (fibrosi de la càpsula de Bowman i esclerosi glomerular, tant segmental i focal com global)⁷³.

Es creu que la toxicitat renal crònica per anticalcineurínics es dona com a conseqüència de la combinació dels canvis hemodinàmics i efectes tòxics directes sobre les cèl·lules epitelials tubulars³⁸.

A nivell vascular, s'observen dipòsits hialins (Figura 9) al voltant de les arterioles aferents (hialinosi arteriolar). La hialinosi arteriolar es caracteritza per un reemplaçament de les cèl·lules musculars llises necròtiques per dipòsits d'una substància proteica hialina que es col·loquen de forma circular o focal a les parets de les arterioles aferents produint una disminució del diàmetre del lumen. Aquesta lesió es considera la lesió histològica distintiva del dany renal crònic per CNIs³⁸, tot i que també existeix certa controvèrsia en aquest punt al no aconseguir resultats reproduïbles en quant a la valoració d'aquestes lesions⁷⁴. En general, aquesta lesió és irreversible tot i que s'ha observat que en alguns casos al baixar la dosi o retirar el tractament immunosupressor es pot donar remodelació vascular^{75,76}. En rates alimentades amb dietes baixes en sal, es va observar vacuolització seguit de l'aparició de dipòsits hialins a les cèl·lules musculars llises al administrar CsA⁷⁷. El mecanisme concret no està del tot establert però es considera que l'efecte es dona per inhibició de la calcineurina i conseqüents efectes sobre NFAT, ja que sembla que té un paper cabdal en el desenvolupament i funció de les cèl·lules musculars llises⁷⁸.

Tant la fibrosi intersticial i atrofia tubular com la glomeruloesclerosi s'atribueixen a la disminució del diàmetre de les arterioles produïda per la hialinosi arteriolar que genera hipòxia local i formació de radicals lliures d'oxigen (ROS) en aquests compartiments. Els ROS, que produeixen dany cel·lular i apoptosi, tenen un paper principal en la nefrotoxicitat per CsA ja que s'ha demostrat que antioxidants com la vitamina E i la catalasa tenen efectes beneficiosos⁷⁹⁻⁸¹.

Es considera que el TGF- β és fonamental en la etiologia de la nefrotoxicitat per CNIs, ja que s'ha demostrat que la CsA i l'FK-506 indueixen, de forma directa i independent dels efectes hemodinàmics, un increment de la seva expressió a nivell

tubular⁸². El TGF- β promou fibrosi intersticial per increment de la síntesi de proteïnes de la matriu extracel·lular i inhibint-ne la degradació^{83,84}. A més, el TGF- β indueix transició epiteli-mesènquima (EMT) a nivell tubular⁸⁵. L'EMT és el procés pel qual les cèl·lules perden les seves propietats epitelials (polaritat i morfologia) i adquireixen característiques mesenquimals tals com expressió de *novo* de α -smooth muscle actin (SMA), de vimentina, reorganització del citoesquelet d'actina, pèrdua de les unions entre cèl·lules per disminució de la expressió de E-Cadherina, destrucció de la membrana basal i increment de la capacitat de migració i d'invasió⁸⁶. Es considera la transició epiteli mesènquima un dels factors que més contribueixen a la fibrosi renal ja que podria ser una font important de miofibroblasts^{87,88}.

La inhibició de la calcineurina i altres efectes d'aquests fàrmacs sobre les cèl·lules tubulars poden produir apoptosi de les cèl·lules tubulars i intersticials, produint així atrofia tubular. S'ha descrit que la CsA produeix citotoxicitat sobre les cèl·lules tubulars en cultiu^{89,90} i apoptosi de les cèl·lules tubulars en biòpsies renals de pacients tractats amb CsA⁹¹. Aquesta citotoxicitat es produeix per inhibició de la progressió del cicle cel·lular per acumulació de p53⁹², estrès de reticle endoplasmàtic⁹³, alteració de la funció mitocondrial i estrès oxidatiu^{89,94} i per d'altres alteracions a nivell estructural⁸⁹. En un treball recent s'ha demostrat, utilitzant un model de toxicitat per CsA *in vitro*, que el desencadenant dels processos de citotoxicitat és l'estrès de reticle endoplasmàtic⁹⁵ que promou la resta d'efectes descrits que finalment condueixen a la mort de la cèl·lula tubular, tal i com es mostra a la Figura 11.

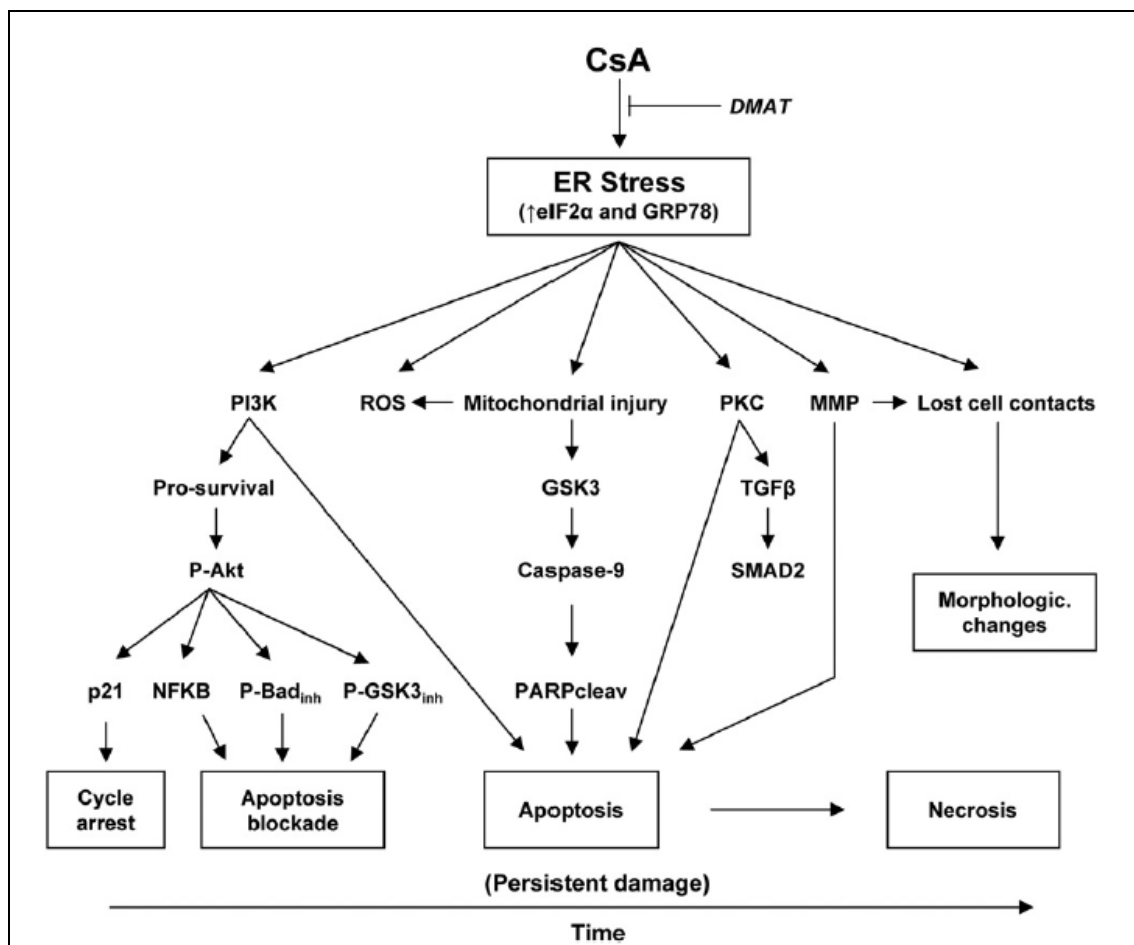


Figura 11. **Model proposat per explicar la toxicitat per CsA en cèl·lules tubulars en cultiu.** L'estrès de reticle endoplasmàtic actuarà com un efector primerenc de la toxicitat per CsA. Inicialment, la cèl·lula tubular intentarà sobreviure mitjançant l'activació de les quinases PI3K i AKT. Tot i això, el tractament sostingut amb CsA induirà l'activació de la via de les caspases per finalment produir apoptosi i necrosi. La producció de radicals lliures d'oxigen (ROS) podria no estar directament implicada en la toxicitat per CsA (Extret de Sarró *et al.*, 2012⁹⁵).

A més, la CsA inhibeix l'activitat de la glicoproteïna-P o MDR-1 (*Multidrug Resistance Protein 1*) que s'expressa a la membrana apical de les cèl·lules tubulars, fet que podria promoure una acumulació local al ronyó de substàncies tòxiques quan s'utilitza aquest fàrmac com a immunosupressor⁹⁶.

Finalment, els danys glomerulars es deuen, en primer lloc, a la hialinosi arteriolar que genera glomeruloesclerosi global o segmental i focal, i en segon lloc, al dany tubular persistent que dona lloc a glomèruls atubulars. Aquests glomèruls desconnectats de la part tubular de la nefrona s'observen sovint acompanyats de fibrosi capsular³⁸.

6.3. FACTORS DE RISC DE LA NEFROTOXICITAT PER CNIS

Existeixen diversos factors clínics de risc que condicionen la toxicitat renal per CNIs³⁸:

a. Exposició a nivells sistèmics elevats de CsA i tacrolimus. Gràcies a la pràctica mèdica, s'ha observat una forta correlació concentració-rebuig i concentració-toxicitat per ambdós fàrmacs, raó per la que s'han de mantenir els nivells sanguinis en un rang estret. Aconseguir mantenir els nivells en els rangs òptims és difícil per la variabilitat inter- i intra-individual en la farmacocinètica d'aquests fàrmacs. Variacions en quan a l'absorció, la distribució, el metabolisme i l'eliminació d'aquests compostos fan que la relació dosi-concentració sigui impredecible. Les diferències entre pacients pel que fa a l'absorció es poden explicar per una expressió i funció diferencials dels isoenzims 3A dels citocroms metabolitzadors P450 (CYP3A4 i principalment CYP3A5) i de la glicoproteïna P (MDR-1). L'activitat d'aquests enzims es pot veure modificada per patologies secundàries del pacient, interacció amb d'altre fàrmacs i per polimorfismes genètics dels citocroms CYP3A.

b. Exposició local al ronyó de CsA i tacrolimus. S'ha observat que tant els nivells de tacrolimus com de ciclosporina A són més elevats al ronyó que a la sang. Els fàrmacs anticalcineurínics bloquegen l'activitat del transportador MDR1 a les cèl·lules tubulars raó per la que es creu que aquests fàrmacs són retinguts a nivell tubular. De la mateixa manera, tot i que no s'ha demostrat en humans i en estudis amb rosegadors els resultats no són concloents, es creu que els individus amb menor activitat de la glicoproteïna P tendeixen a acumular més CsA o FK-506 a nivell renal.

c. Exposició a metabòlits de la CsA o tacrolimus. Els metabòlits secundaris de la CsA i FK-506 es troben en concentracions més elevades en sang i a nivell renal que els propis fàrmacs. La importància que poden tenir aquests metabòlits sobre la nefrotoxicitat per fàrmacs anticalcineurínics no està elucidada del tot. Alguns dels metabòlits de la CsA, tot i no tenir activitat immunosupressora, produeixen un descens del filtrat glomerular i vacuolització isomètrica, raó per la qual potencialment podrien contribuir a l'efecte tòxic de la CsA.

d. Altres factors de susceptibilitat. El dany pre-existent en el ronyó degut a l'edat del donant és un factor de risc en si mateix ja que a major edat de l'òrgan més danyats es troben els mecanismes de reparació cel·lular. A més a més, l'ús d'antiinflamatoris no esteroïdals, les dietes pobres en sal, l'ús de diürètics i variants genètiques del TGF- β i de l'enzim convertidor de l'angiotensina (ACE) influeixen en el desenvolupament de la nefrotoxicitat per CNIs.

7. DIAGNÒSTIC DIFERENCIAL I MARCADORS DE NEFROTOXICITAT PER FÀRMACS CNIS

La nefrotoxicitat per CNIs es manifesta clínicament com a un descens de la funció renal. Malgrat tot, els nivells de creatinina sèrica, la taxa de filtració glomerular (GFR, *glomerular filtration rate*) i la proteïnúria usats per predir i diagnosticar aquesta disfunció renal són poc específics i tardans. Pel diagnòstic de nefrotoxicitat per CNIs, ara per ara, cal una biòpsia del ronyó trasplantat.

7.1. VALORACIÓ DE LES LESIONS HISTOLÒGIQUES CAUSADES PER CNIS I NOVES APROXIMACIONS MOLECULARS

Com s'ha mencionat anteriorment, en transplantament renal utilitzant un diagnòstic histopatològic, és difícil diferenciar el dany renal produït per fàrmacs CNIs d'altres tipus de disfunció renal ja que moltes d'elles comparteixen el mateix quadre clínic i histològic. Les lesions més característiques de la toxicitat renal per CsA i FK-506 com vacuolització isomètrica a nivell tubular i la hialinòsi arteriolar progressiva, també s'observen de forma secundària a altres processos tals com isquèmia tubular, exposició a d'altres tipus de substàncies nefrotòxiques, dany per hipertensió o diabetis i per lesions preexistents³⁸. En transplantament no renal, el diagnòstic és més simple i clar, tot i que cal tenir en compte que la malaltia subjacent del pacient o tractaments concomitants poden produir disfunció renal amb signes similars als de toxicitat renal per CNIs.

Un dels principals problemes del diagnòstic mitjançant valoració de lesions en biòpsies de l'empelt renal és la baixa reproductibilitat intra i inter-centres. En un treball recent s'ha proposat un mètode per tal d'estandarditzar-ne la valoració

mitjançant un índex semiquantitatiu anomenant *CNIT score* (*Calcineurin inhibitor toxicity score*). Amb aquest sistema, es valora el grau (de 0 a 3) de glomeruloesclerosi, d'atròfia tubular, hialinòsi arteriolar i vacuolització isomètrica, i es calcula l'índex utilitzant un mètode de regressió lineal múltiple. Aquest índex calculat als 3 mesos correlaciona de forma significativa amb l'aclariment de la creatinina als 12 i 24 mesos post-trasplantament. Sembla que el factor que més influeix en el *CNIT score* és la hialinòsi arteriolar. Aquest fet, limita la utilitat de l'índex ja que es tracta d'una lesió crònica i, en general, irreversible. Per tant, quan s'obté un *score* elevat el dany ja és molt avançat⁹⁷.

El coneixement més acurat dels mecanismes que contribueixen a la toxicitat renal per CNIs hauria de permetre identificar nous marcadors. La detecció del procés de transició epiteli-mesenquima induïda per CNIs mitjançant la valoració de canvis fenotípics epitelials tals com increment de l'expressió *de novo* de vimentina o la translocació intracel·lular de β -catenina permet predir de forma més acurada l'aparició de fibrosi a l'empelt renal que qualsevol altre marcador clàssic. L'associació d'aquests canvis fenotípics de les cèl·lules tubulars amb la toxicitat renal per CNIs en humans encara és desconeguda, però en rates tractades amb CsA s'ha observat un increment de la expressió de vimentina, que s'expressa en el procés a nivell tubular. Paral·lelament, s'ha demostrat que la sobre-expressió a nivell tubular de la proteïna BIP (*Binding Immunoglobulin protein*) o GRP-78 (*78 kDa glucose-regulated protein*), una de les proteïnes responsables de l'estrès de reticle endoplasmàtic, s'associa a un major risc de fibrosi renal i que pacients sota règim immunosupressor de CsA expressen més BIP que pacients tractats amb sirolimus. Per tant, la valoració de l'estrès de reticle a les cèl·lules tubulars podria ser un indicador primerenc de toxicitat per CNIs⁹⁸.

S'han portat a terme nombrosos estudis per tal d'identificar noves proteïnes específicament alterades per CsA o FK-506 tant en models *in vivo* com *in vitro*. Österholm *et al.*⁹⁹ van descriure que el factor tissular o factor III de la cascada de coagulació incrementa la seva expressió en el *brush border* de les cèl·lules tubulars en pacients en episodis de nefrotoxicitat aguda per CsA de forma molt significativa. En pacients amb toxicitat crònica per CsA també s'observà aquesta sobreexpressió

respecte pacients no sotmesos a tractament immunosupressor amb CsA, tot i que no es va poder diferenciar de la vasculopatia crònica de l'empelt.

Puigmulé et al.⁸⁹, utilitzant cèl·lules tubulars en cultiu, van realitzar un anàlisi proteòmic diferencial de proteïnes expressades per CsA respecte a cèl·lules no tractades. Es van identificar diferents proteïnes modulades per CsA relacionades amb el metabolisme energètic, de proteïnes, d'àcids nucleics així com estructurals i de resposta al dany cel·lular. Algunes d'elles es van validar en un model murí de toxicitat renal per CsA confirmant d'aquesta manera els resultats obtinguts *in vitro*⁸⁹. Altres autors han realitzat anàlisi d'expressió diferencial de proteïnes en ronyons de rates tractades amb CsA o FK-506 utilitzant *microarrays de RNA* identificant expressió diferencial a nivell tubular de diversos transportadors d'ions¹⁰⁰. Aquestes proteïnes diferencialment expressades per fàrmacs CNIs potencialment podrien ser utilitzades com a marcador específic de nefrotoxicitat per anticalcineurínics per diagnòstic histopatològic.

7.2. BIOMARCADORS CLÀSSICS NO INVASIUS DE DISFUNCIÓ RENAL

La taxa de filtrat glomerular (GFR, *glomerular filtration rate*) és l'indicador funcional de l'activitat del ronyó. Idealment, per calcular el filtrat glomerular és necessari la mesura en sèrum d'una molècula endògena o exògena que sigui totalment filtrable a nivell glomerular, que no es sintetitzi ni es destrueixi, ni es reabsorbeixi o es secreti a nivell tubular i que sigui fisiològicament inert. La mesura d'una molècula amb les característiques descrites permetria calcular el seu aclariment, entès com el volum de plasma que, per efecte de la funció renal, queda lliure d'aquesta substància per unitat de temps. Diferents molècules exògenes tals com la inulina, l'iohexol, l'iothalamate i substàncies marcades radioactivament (^{99m}Tc-*diethylenetriamine penta-acetic acid* (DTPA) o ⁵¹Cr-EDTA) han estat testades obtenint bons resultats. Tot i això, aquests assajos presenten limitacions que els fa poc aplicables: són costosos i alguns requereixen infraestructures especialitzades. Per aquesta raó, en la pràctica clínica general, s'utilitzen els nivells sèrics d'urea o creatinina que permeten estimar la taxa de filtrat glomerular (eGFR, *estimated glomerular filtration rate*) i la proteïnúria i/o l'albuminúria. Aquests marcadors

detecten dany renal avançat i serveixen per detectar qualsevol tipus de disfunció renal.

7.2.1. Urea i creatinina sèrica

A principis de 1900, es va introduir a la pràctica clínica la valoració dels nivells d'urea sèrica o BUN (*Blood Urea Nitrogen*) per predir la eGFR. La urea és el major residu del metabolisme proteic i s'elimina casi totalment per excreció urinària. Per tant, en un context de disfunció renal els nivells d'urea sèrics incrementen mentre que en orina baixa la seva concentració. Tot i que encara el BUN és utilitzat per determinar la funció renal, s'ha demostrat que la estimació del filtrat glomerular utilitzant els nivells d'urea sèrica és subòptima ja que la concentració en sèrum es pot veure incrementada per factors no directament relacionats amb un descens del GFR.

A mitjans del segle XX, es va començar a utilitzar la creatinina sèrica i actualment segueix sent el mètode de preferència per determinar el eGFR. La creatinina es genera de forma més o menys regular a partir de la deshidratació no enzimàtica de la creatina muscular pel que els nivells sanguinis d'aquest metabòlit són proporcionals a la massa muscular. La creatinina es filtra lliurement a través del glomèrul i no es reabsorbeix tubularment, tot i que es secreta de forma variable. Es consideren normals valors de creatinina sèrica de 0.7 a 1.3 mg/dl per als homes i de 0.6 a 1.1 mg/dl per a les dones.

Un dels majors problemes que presenta la concentració de la creatinina en sang és el fet que la secreció tubular incrementa quan baixa el GFR i per tant no s'observa un increment de creatinina en sèrum fins que no baixa de forma important la taxa de filtrat glomerular. Per tal d'incrementar-ne la fiabilitat, s'han desenvolupat diferents equacions basades en la creatinina sèrica per tal d'estimar la taxa de filtrat glomerular, les més destacables són Cockcroft-Gault, *Modification of Diet in Renal Disease* (MDRD) i CKD-EPI (*Chronic Kidney Disease-Epidemiology Collaboration*) pels adults, i la de Schwartz pels infants (figura 12).

Name	Equation
Adults	
Cockcroft–Gault	$eCrCl^b$ (mL/min) = (140 – age in years) × (weight in kilograms/72 × Scr) × (0.85 if female)
MDRD (4-variable, not IDMS-traceable)	$eGFR$ [$mL \cdot min^{-1} \cdot (1.73 m^2)^{-1}$] = 186 × (SCr) ^{-1.154} × (age in years) ^{-0.203} × (0.742 if female) × (1.212 if African American)
MDRD (IDMS-traceable creatinine)	$eGFR$ [$mL \cdot min^{-1} \cdot (1.73 m^2)^{-1}$] = 175 × (Scr) ^{-1.154} × (age in years) ^{-0.203} × (0.742 if female) × (1.212 if African American)
CKD-EPI (IDMS traceable)	$eGFR$ [$mL \cdot min^{-1} \cdot (1.73 m^2)^{-1}$] = 141 × min (Scr/κ, 1) ^α × max(Scr/κ, 1) ^{-1.209} × 0.993 ²⁰⁹ × (1.018 if female) × (1.159 if African American), where κ is 0.7 for females and 0.9 for males, α is -0.329 for females and -0.411 for males, min indicates the minimum of S _{cr} /κ or 1, and max indicates the maximum of S _{cr} /κ or 1]
Children	
Modified Schwartz	$eGFR$ [$mL \cdot min^{-1} \cdot (1.73 m^2)^{-1}$] = (0.413 × height in centimeters)/(Scr)
^a For all equations listed, serum creatinine (Scr) is in milligrams per deciliter.	
^b eCrCl, estimated Cr clearance; IDMS, isotope dilution mass spectrometry; CKD-EPI, Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration.	

Figura 12. **Equacions per a estimar la taxa de filtrat glomerular.** Equacions de Cockcroft-Gault, MDR i CK-EPI per estimar la taxa de filtrat glomerular (Extret de Ferguson *et al.*, 2012¹⁰¹).

Totes aquestes equacions presenten limitacions. A baixes concentracions de creatinina, mentre que MDRD subestima el GFR, les equacions Cockcroft-Gault i Schwartz el sobrestimen. A més, no tenen en compte diferències en quant als nivells de creatinina que es donen per variacions en la massa muscular ni per raons ètniques.

També, la mesura en sèrum de proteïnes de baix pes molecular com la β2-microglobulina, *β-trace protein* (βTP) o la cistatina C, permet predir la taxa de filtrat glomerular. Aquestes proteïnes passen lliurement a través del glomèrul, són reabsorbides i catabolitzades per les cèl·lules tubulars i no secretades. La més prometedora és la cistatina C, una proteïna de 122 aminoàcids que es produïda per totes les cèl·lules nucleades i els seus nivells sanguinis són independents de l'edat, el sexe i la massa corporal. Els nivells de cistatina C han resultat ser més sensibles per predir una davallada de GFR però els seus mètodes de mesura no han estat estandarditzats entre diferents laboratoris, fet que dificulta la comparació de dades i la validació clínica d'aquest marcador¹⁰¹.

7.2.2. Proteïnúria i albuminúria

En condicions no patològiques, el glomèrul limita la filtració de macromolècules per la seva mida i càrrega elèctrica de forma que les proteïnes de mida gran no són filtrades (aproximadament >60 KDa), i les proteïnes de menor mida (aproximadament <60KDa) són filtrades, tot i que la majoria són reabsorbides posteriorment per les cèl·lules tubulars. Com a resultat d'ambdós processos, les proteïnes són poc presents en orina¹⁰². Quan el ronyó no funciona de forma correcta, el contingut proteic de la orina incrementa significativament i s'associa a progressió del dany renal crònic ja que la proteïnúria, en si mateix, és un factor de risc de la seva progressió. Habitualment, s'excreten per la orina 40-80 mg de proteïnes al dia de les quals un 10-15 mg és albúmina i la resta és *Tamm-Horsfall protein* o uromodulina, una proteïna sintetitzada pels epitelis tubulars, i algunes proteïnes de baix pes molecular. En general, es considera que un contingut proteic per sobre de 150 mg per dia és patològic, tot i que hi ha molta variació individual i, ara per ara, no existeix un valor discriminatori universal¹⁰³.

Fisiopatològicament, la proteïnúria es pot classificar en diferents categories atenent al seu origen^{102,103}:

a. Prerenal o per sobrecàrrega de filtrat. Es produeix degut a una sobreproducció d'algun tipus de proteïna plasmàtica petita que, per sobrecàrrega, el túbul no és capaç de reabsorbir. En adults, la forma més freqüent es dona per eliminació de les cadenes lleugeres secundària a mieloma.

b. Renals. Es donen per disfunció dels glomèruls o els túbuls o de tots dos compartiments de la nefrona. Es poden agrupar en tres grups:

1. Proteïnúria glomerular. La proteïnúria glomerular es caracteritza per presència de proteïnes d'alt pes molecular i es dona per pèrdua de l'electronegativitat de la membrana basal o per alteracions estructurals del glomèrul. La proteïna més abundant en aquest tipus de proteïnúria és l'albúmina, si supera el 85% s'anomena proteïnúria selectiva. Quan la proteïnúria no es selectiva, és a dir que apareixen tot tipus de

macromolècules proteiques a la orina, s'associa a lesions estructurals més severes.

2. Proteïnúria tubular. És el resultat de la disminució de la reabsorció de proteïnes de baix pes molecular en el túbul proximal o de l'augment de la secreció en d'altres segments tubulars. Són proteïnúries que s'associen a una disfunció renal lleugera o moderada, mai severa.

3. Proteïnúria mixta. Es caracteritza per l'aparició de proteïnes d'alt i baix pes molecular a la orina com a resultat de la disfunció de tota la nefrona.

c. Postrenal. Es dona com a conseqüència de processos inflamatoris, infecciosos o hemorràgics a les vies urinàries. Aquests processos poden induir la secreció epitelial de proteïnes al fluid tubular.

d. Ortostàtica. És causada per canvis hemodinàmics a nivell glomerular en posició ortostàtica. Es tracta d'un efecte transitori ja que desapareix en posició supina. No s'associa a mal pronòstic excepte si s'acompanya d'hipertensió o d'alteracions en el sediment urinari.

L'aparició de quantitats significatives d'albumina a la orina, o albuminúria, es considera, ara per ara, el millor marcador de progressió de la malaltia renal, de problemes cardiovasculars i de mortalitat associada a aquests processos¹⁰¹⁻¹⁰³, ja que dins el rang no patològic els pacients amb menor quantitat d'albumina tenen millor pronòstic. Es considera normal una excreció d'albumina de menys de 30mg/dia, valors superiors a aquests són considerats patològics i es relacionen de forma inversament proporcional amb el filtrat glomerular¹⁰³.

7.3. NOUS BIOMARCADORS NO INVASIUS DE DANY RENAL. RELACIÓ AMB NEFROTOXICITAT PER CNIS

Pel que fa a nous biomarcadors no invasius, presents en sang i/o orina, encara no n'existeix cap que s'associï directament a disfunció renal per anticalcineurínics ni que permeti predir-ne l'aparició. En les últimes dècades, s'han fet grans esforços per descobrir i validar nous marcadors de dany renal que s'avancin a l'increment de creatinina sèrica i a l'aparició de proteïnúria. Mesurant els nivells d'aquest tipus de

proteïnes en orina o en sèrum, és possible detectar insuficiència renal aguda, alguns inclús permeten predir l'aparició d'insuficiència renal crònica, malgrat això, resta per demostrar que permetin detectar dany renal abans que els nivells de creatinina sèrica o l'aparició de proteïnúria¹⁰⁴, i en cap cas són específics d'un tipus de dany renal concret¹⁰¹. Alguns d'ells estan sent validats per ser incorporats a la pràctica clínica. Els més destacables són:

a. La *Kidney Injury Molecule-1* (**KIM-1**) és una proteïna transmembrana de 90 KDa la expressió de la qual es troba incrementada al túbul proximal en resposta a un dany tubular, tant en humans com en animals. L'ectodomini d'aquesta proteïna s'allibera a la orina per un procés de *shedding* enzimàtic, raó per la qual la valoració dels nivells urinaris de KIM-1 permet conèixer el grau de disfunció renal¹⁰⁵. Tant els nivells tubulars de KIM-1 com la seva concentració en orina correlacionen amb la funció renal en pacients trasplantats de ronyó¹⁰⁶. Malauradament, és poc específic ja que s'expressa enfront a qualsevol alteració tubular¹⁰⁶ i es troba en orina de pacients amb carcinoma renal de cèl·lules clares¹⁰⁷.

b. La *Neutrophil gelatinase associated lipocalin* (**NGAL**) és una proteïna de 25 KDa que s'expressa en neutròfils i en certs epitelis. Enfront un dany renal, les cèl·lules tubulars incrementen la expressió d'aquesta proteïna i l'alliberen tant a la sang com a la orina. Els nivells en orina de NGAL s'atribueixen fonamentalment a la disfunció renal mentre que els nivells sèrics provenen d'altres òrgans¹⁰⁵. Els resultats de la validació clínica de NGAL com a biomarcador de disfunció renal no són concloents, mentre uns autors l'associen clarament a insuficiència renal aguda i a disfunció de l'empelt renal^{101,108} altres obtenen resultats contradictoris¹⁰⁹. Recentment, s'ha intentat correlacionar els nivells de NGAL, sèrics i urinaris, amb la nefrotoxicitat per CsA obtenint resultats poc concloents¹¹⁰. En portadors d'un empelt hepàtic immunodeprimits amb CNIs, s'ha observat un increment dels nivells en orina i en sèrum de NGAL previ a la pujada dels nivells de creatinina sèrica en aquells pacients que van patir algun episodi de insuficiència renal aguda respecte als que no en van patir. Això, suggereix que podria ser un marcador de disfunció renal en transplantament no

renal relacionat amb comorbiditats associades o bé amb l'efecte nefrotòxic de l'immunosupressor¹¹¹.

c. La N-acetil-β-(D)-glucosaminidasa (NAG) un enzim lisosomal que apareix en orina mitjançant microsomes tubulars, s'ha associat a insuficiència renal aguda tot i que s'ha descrit que té una especificitat subòptima en alguns grups de validació¹⁰¹. S'ha relacionat els nivells de NAG en orina amb el descens de la taxa de filtració glomerular produït per CsA però també amb fenòmens de rebuig i amb dany per isquèmia^{112,113}.

d. La interleucina 18 (IL-18) es troba en orina en nivells significativament majors en pacients en episodis d'insuficiència renal aguda respecte aquells pacients amb infecció urinària o insuficiència renal crònica. La IL-18 és un factor altament inflamatori sintetitzat per macròfags i altres cèl·lules presents al ronyó enfront un dany per isquèmia-reperfusió¹⁰⁵. Es creu que potencia el procés de necrosi tubular contribuint al procés de rebuig de l'empelt^{105,114}. En pacients trasplantats hepàtics tractats amb CsA o FK-506, s'ha observat que IL-18 es troba incrementada en orina i en sèrum a les 24h post-transplantament en aquells pacients que generen dany renal agut¹¹¹.

e. La Fatty Acid Binding Protein (FABP) és una proteïna de 15 KDa que s'expressa a les cèl·lules tubulars. N'hi ha de dos tipus, la *Liver-type FABP* que s'expressa a les cèl·lules del túbul proximal i la *Heart-type FABP* que s'expressa a nivell distal. Ambdues s'han trobat incrementades en sèrum en pacients amb disfunció renal. L-FABP, és present a la orina en pacients amb dany renal per isquèmia, per metalls pesats i de progressió al dany renal crònic¹¹⁵. La presència de L-FABP en orina, s'ha associat també a disfunció de l'empelt renal però no a la disminució del filtrat glomerular en pacients trasplantats de cor pel que no s'associa a dany renal per fàrmacs CNIs¹¹⁶.

L'estudi de metabòlits (d'un o de diversos) també és interessant a la hora de cercar nous biomarcadors de funció renal, tant en sang com en orina. En el camp del trasplantament renal podria resultar útil monitoritzar diversos metabòlits per tal detectar dany renal i identificar-ne la causa. Per exemple, s'ha observat, utilitzant estudis metabolòmics, que en pacients amb toxicitat per CsA o FK-506 mostren

nivells sèrics elevats d'àcid úric (agent nefrotòxic), de homocisteïna i d'altres marcadors de risc cardiovascular^{117,118}.

7.4. CAMPS EMERGENTS EN LA CERCA DE BIOMARCADORS NO INVASIUS

Donat que la orina és un fluid directament generat pels ronyons, al llarg dels anys s'ha tendit a estudiar les proteïnes (proteòmica) i metabòlits (metabolòmica) presents en la orina que puguin ajudar a entendre la fisiopatologia renal. Actualment, hi ha un interès creixent en l'estudi d'altres factors presents en la orina tals com els microRNA, cèl·lules i exosomes presents en la orina.

Els microRNA o miRNA són petites molècules de RNA no codificant que controlen la expressió gènica regulant les funcions del RNA missatger tot modulant l'expressió de diverses proteïnes, raó per la qual són un camp molt interessant en la cerca de biomarcadors. En general, es troben en compartiments intracel·lulars però s'ha demostrat que són relativament estables en fluids corporals com la sang o la orina. La presència de certs tipus de miRNA en orina o sang podria ser indicador d'un tipus de disfunció renal concret¹¹⁹. El miRNA-210, s'ha trobat incrementat en sang aportant alt valor pronòstic en pacients amb dany renal agut¹²⁰. En orina s'ha relacionat amb rebuig agut de l'empelt renal mediat per cèl·lules T¹²¹. És més, el conjunt de diferents miRNA en orina pot ser utilitzat com a indicador d'un determinat procés. La presència en orina de miR-21, miR-29 i miR-93, efectors de la via del TGF- β , podria ser indicador de fibrosi intersticial en pacients amb nefropatia per IgA¹²². L'estudi de miRNA no es limita tant sols als fluids si no que també s'han relacionat amb el desenvolupament i fisiologia normal del ronyó (així com de la resta dels òrgans) i tenen un paper molt rellevant en el fisiopatologia ja que podrien actuar en la comunicació entre cèl·lules^{119,123}.

Les cèl·lules presents en la orina, derivades dels ronyons i el tracte urinari, podrien expressar proteïnes i/o miRNA que permetrien diferenciar un tipus de dany renal d'un altre. L'anàlisi d'expressió urinària de diferents proteïnes relacionades amb el procés de transició epiteli mesènquima (E-cadherina, N-cadherina, TGF- β ...) en pacients trasplantats de ronyó discrimina pacients amb rebuig agut diagnosticat d'altres tipus de disfunció de l'empelt i podria predir el risc de desenvolupar fibrosi

intersticial¹²⁴. La expressió en cèl·lules urinàries de *miR-21* i *miR-216a* correlaciona amb el descens de GFR i el risc de progressió de la insuficiència renal crònica¹²⁵.

Una altra font de biomarcadors emergent són els exosomes, que contenen proteïnes, metabòlits, mRNA i miRNA provinents dels compartiments intracel·lulars. Els exosomes són vesícules de membrana plasmàtica de 50 a 100 nm de diàmetre que s'alliberen als fluids corporals per exocitosi derivada dels cossos multivesiculars (MVP, *multivesicular bodies*), intermediaris en la via de transport endolisosomal (Figura 13).

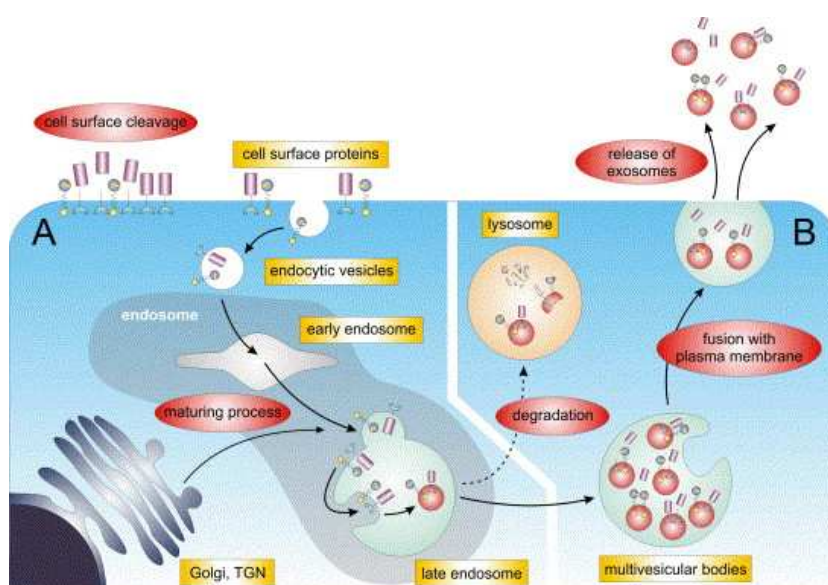


Figura 13. **Biogènesi dels exosomes.** Per invaginació de la membrana plasmàtica i posterior processat per la via de transport endocítica es reciclen proteïnes de membrana i s'incorporen substàncies a les cèl·lules (A). En general, el contingut dels endosomes tardans es degradat als lisosomes, però en algunes ocasions de forma constitutiva o induïda es generen cossos multivesiculars (MVBs) que es poden fusionar amb la membrana plasmàtica alliberant el seu contingut, els exosomes i d'altres substàncies, a l'exterior (B). (Extret i adaptat de Keller *et al.*, 2006¹²⁶)

Els exosomes es diferencien d'altres tipus de vesícules per la presència de marcadors específics (CD-63, CD-81, CD-9 i TSG-101, entre d'altres) i podrien tenir un paper rellevant tant en condicions fisiològiques com patològiques. Es creu que promouen el contacte directe entre cèl·lules mitjançant processos d'endocitosi o de fusió amb la membrana plasmàtica. Els exosomes podrien ser el vehicle per transferir de forma horitzontal DNA, mRNA, miRNA i proteïnes¹²⁷. Aquesta transferència de material podria conferir a les cèl·lules capacitat de produir diferents respostes en determinades condicions com per exemple resistència a tòxics o

apoptosis¹²⁸. La presència de exosomes urinaris va ser descrita per primera vegada per Pisitkun *et al.* per tal d'elucidar la raó de l'aparició de l'aquaporina 2, un canal tubular transmembrana, a la orina¹²⁹. L'aïllament d'exosomes urinaris i anàlisi del seu contingut és un ampli camp a explorar per comprendre millor la fisiopatologia renal i com a font de biomarcadors de disfunció renal¹³⁰⁻¹³².

Tots aquests avenços, tant en coneixement del contingut de la orina com de les tècniques analítiques, podrien permetre en un futur un diagnòstic de disfunció renal personalitzat. S'estan fent grans esforços per tal de validar els assajos d'expressió de múltiples proteïnes i/o miRNA simultàniament en un determinat fluid o teixit, anomenats *profilings* de RNA o miRNA. Aquestes aproximacions generen un immensa quantitat d'informació que analitzada correctament podria informar de processos concomitants que permetrien conèixer en quin estat patològic es troba cada pacient.

En contraposició, cal tenir en compte que tant les cèl·lules presents en la orina com els exosomes i els miRNA poden derivar de ronyó, però també del tracte genito-urinari amb el risc que suposa de detectar biomarcadors poc específics. A més, molts dels estudis publicats tenen un disseny pobre, són estadísticament poc potents o no han passat de la fase de "descobriment". La complexitat en la validació fa que pocs dels nous biomarcadors arribin a incorporar-se a la pràctica clínica¹³³.

7.5. PROBLEMA DELS MARCADORS DE FUNCIO RENAL EXISTENTS. NECESSITAT DE NOUS BIOMARCADORS

Com s'ha detallat anteriorment, els marcadors més emprats per determinar la funció renal (creatinina sèrica, la proteïnúria i l'albuminúria) són marcadors que indiquen dany renal (o de l'empelt) de qualsevol tipus de forma tardana. S'han fet molts esforços al llarg de les últimes dècades per identificar indicadors que permetin detectar pèrdua de funció renal abans que els marcadors existents cosa que s'ha aconseguit tant sols amb la cistatina C que encara està acabant de ser validada. També, s'han fet grans avanços en quant a coneixement de molècules que indiquen alteració del metabolisme normal del compartiment tubular. Proteïnes com KIM-1, NGAL i FABP, entre d'altres, estan sent validades com a nous biomarcadors de dany

renal. Tot i això, no existeix, ara per ara, cap metabòlit o proteïna que ajudi a diferenciar diferents tipus de dany renal.

En el període immediat post-trasplantament renal, que pot oscil·lar entre 7 dies i 5 setmanes depenent del pacient, es poden donar diversos factors que poden retardar la recuperació de la funció renal. Entre un 25 i un 30% dels pacients presenten fracàs renal agut després de la intervenció i poden necessitar diàlisi després del trasplantament. Entre els factors que poden influir en la recuperació de la funció de l'empelt renal es troben lesions pre-existents a l'empelt, lesions degudes a la isquèmia-reperfusió, problemes en la vascularització de l'empelt, obstruccions del tracte urinari, factors de tipus immunològic i la toxicitat per fàrmacs (fonamentalment CNIs, analgèsics i antiinflamatoris no esteroïdals). Aquests factors o la combinació d'ells porta a vasoconstricció dels capil·lars renals que pot conduir a necrosi tubular aguda (NTA). En general, després d'una setmana de diàlisi el pacient recupera la funció renal. En alguns casos però, la oligúria persisteix més de 7 dies i es pot associar a rebuig de l'empelt o a nefrotoxicitat per CNIs. En aquests pacients s'avaluen els nivells en sang d'immunosupressors CNI. Si presenten nivells en sang de CsA o FK-506 elevats se'n redueix la dosi amb l'objectiu d'observar una millora en la funció renal. Si no s'observa milloria es poden sospitar fenòmens de rebuig que impedeixen la correcta recuperació de la funció renal. En tal cas, cal realitzar una biòpsia per descartar dany renal per CNIs i confirmar el rebuig de l'empelt.

La causa de la disfunció de l'empelt a llarg termini és més difícil de conèixer. En general s'atribueix a la combinació de factors que condicionen la vida de l'empelt, tant immunològics com no immunològics. L'única manera de discriminar la nefrotoxicitat per CNIs és realitzant un anàlisi histopatològic, amb les limitacions diagnòstiques prèviament esmentades.

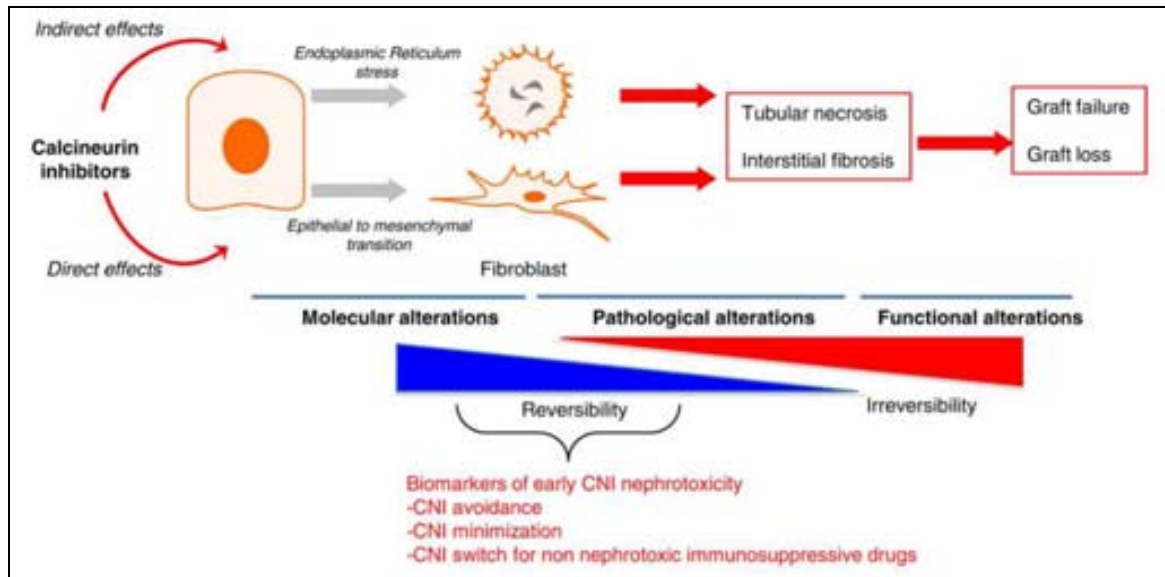


Figura 14. **Esquema de les diferents fases de la toxicitat renal per fàrmacs anticalceurínics i de la sensibilitat dels biomarcadors coneguts.** Els biomarcadors coneguts permeten tant sols detectar dany renal avançat ja que apareixen entre les fases d'alteracions patològiques i alteracions funcionals quan les lesions són irreversibles (Extret de Pallet *et al.*, 2011⁹⁸)

Amb els coneixements actuals i els marcadors existents, el moment més primerenc possible en que podem detectar el dany per CsA i FK-506 és en la fase d'alteracions histològiques reversibles. Si no s'efectua una biòpsia, aquestes alteracions poden passar per alt, fins a observar alteracions funcionals (figura 14). Per aquest motiu, hi ha un interès creixent en identificar biomarcadors no invasius i específics per detectar i/o diagnosticar la nefropatia crònica de l'empelt (CAN) en estadi primerenc quan tant sols existeixen alteracions moleculars i poder així discernir-ne la causa per tal de poder triar la teràpia adequada.

OBJECTIUS

Els CNIs representen actualment la base del tractament immunosupressor usat per tal d'evitar el rebuig de l'òrgan trasplantat. Tot i que s'han combinat amb d'altres fàrmacs immunosupressors antiproliferatius (MMF, sirolimus i corticoides, entre d'altres) per tal de minimitzar-ne la dosi, la toxicitat renal a llarg termini segueix essent una problemàtica a nivell clínic. Molts estudis defensen que els CNIs produeixen un dany a nivell vascular i tubular que podria contribuir a la fibrosi intersticial i atròfia tubular característica d'estadis avançats de la nefropatia crònica de l'empelt (CAN). Fins al moment, no s'han desenvolupat biomarcadors que permetin diferenciar el dany renal produït per fàrmacs anticalcineurínics d'altres tipus de dany. Per aquestes raons i pels antecedents prèviament esmentats, l'objectiu general que es planteja en aquesta tesi és la identificació de putatius **biomarcadors de disfunció crònica** de l'empelt renal que siguin **diferencials per nefrotoxicitat per fàrmacs anticalcineurínics, primerencs i no invasius**.

La hipòtesi de treball és:

“Les cèl·lules derivades de túbul proximal sota diferents noxes (fàrmacs CNIs, fàrmacs no CNIs i compost inductor d'apoptosi) en condicions subtòxiques secretaran proteïnes específiques que podrien ser detectades en sang i/o orina i permetre diferenciar diferents tipus de dany renal de forma primerenca en pacients trasplantats sota règim immunosupressor anticalcineurínic”

Per tal de demostrar la hipòtesi esmentada els objectius concrets són:

1. Identificació de possibles biomarcadors de disfunció renal per CNIs en un model "in vitro" de túbul proximal renal.
 - 1.1. Determinació de les dosis subtòxiques de cada un dels noxes (CsA, FK506, Rapamicina i staurosporina) en cèl·lules tubulars humanes en cultiu.
 - 1.2. Estudi proteòmic bidimensional dels medis d'aquestes cel·lules tractades en les condicions subtòxiques prèviament establertes i identificació de proteïnes diferencialment secretades per fàrmacs anticalcineurínics (CsA i/o FK506) per espectrometria de masses.

2. Validació en mostres humanes dels resultats obtinguts al punt 1 dels Objectius.

2.1. Determinar la presència o absència de les proteïnes identificades en l'objectiu 1 en orina i/o plasma de pacients trasplantats de ronyó o de pulmó sota règim immunosupressor d'anticalcinurínics.

2.2. En cas que es detectin les proteïnes identificades en l'objectiu 1 en mostres de pacients trasplantats, comprovar la seva vàlua com a biomarcador de nefrotoxicitat per fàrmacs anticalcineurínics.

3. Caracterització funcional dels possibles biomarcadors, identificats en els punts anteriors, en la nefrotoxicitat per CNIs.

3.1. Per aquelles proteïnes identificades en l'objectiu 1 que correlacionin amb dany renal per fàrmacs anticalcineurínics en mostres de pacients trasplantats, estudiar la seva possible implicació en el mecanisme molecular del dany tubular causat per fàrmacs anticalcineurínics.

MATERIALS, MÈTODES I PACIENTS

1. DISSENY EXPERIMENTAL

Per tal d'assolir els objectius proposats en aquest treball, identificar nous biomarcadors de dany renal per fàrmacs anticalcineurínics (CNIs) que siguin primerencs, diferencials d'aquest tipus de dany i no invasius, i atenent a la hipòtesi plantejada (esquematzada a la Figura 15), proposem el disseny experimental que es detalla a continuació.

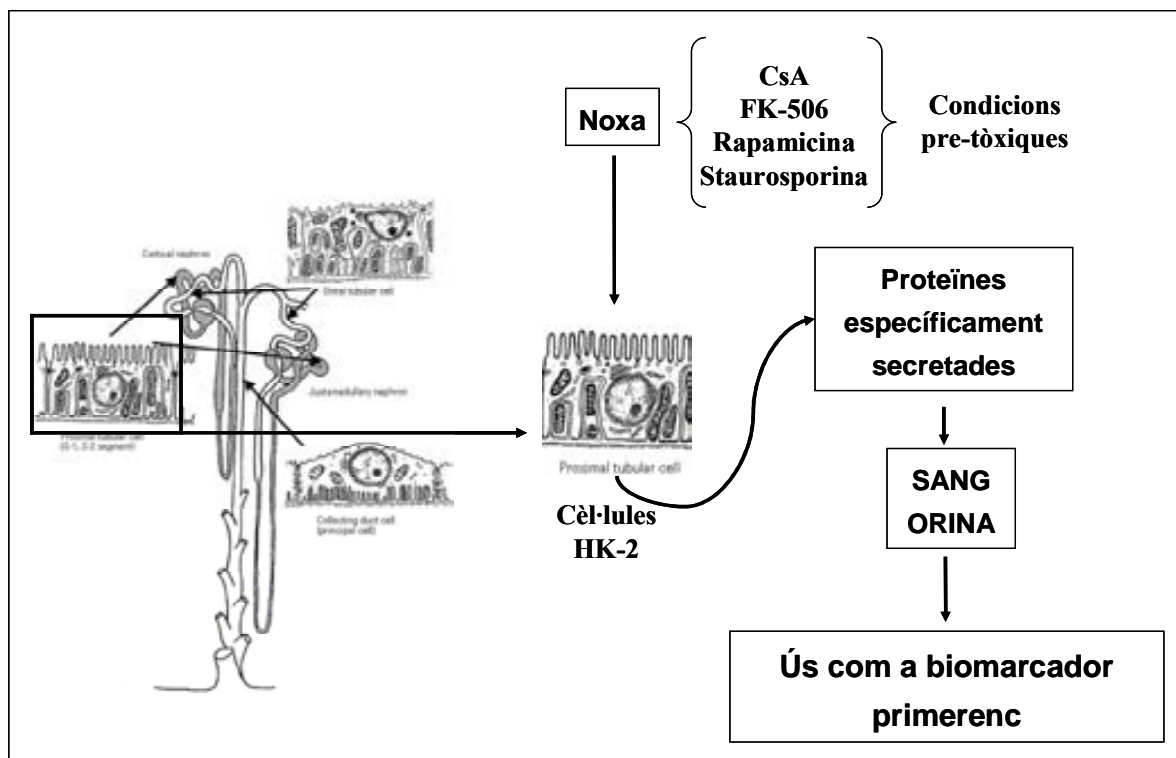
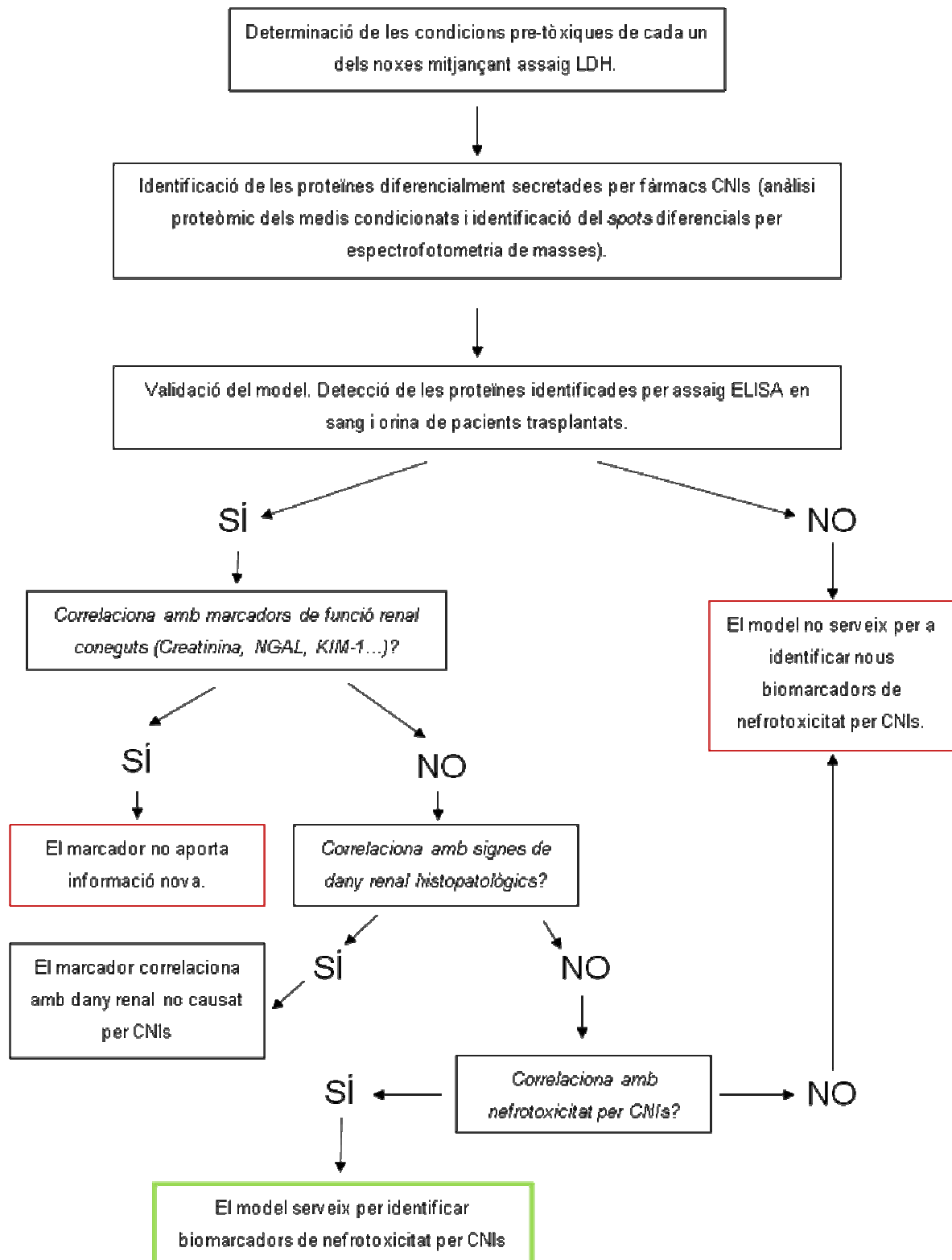


Figura 15. Esquema de la hipòtesi plantejada.

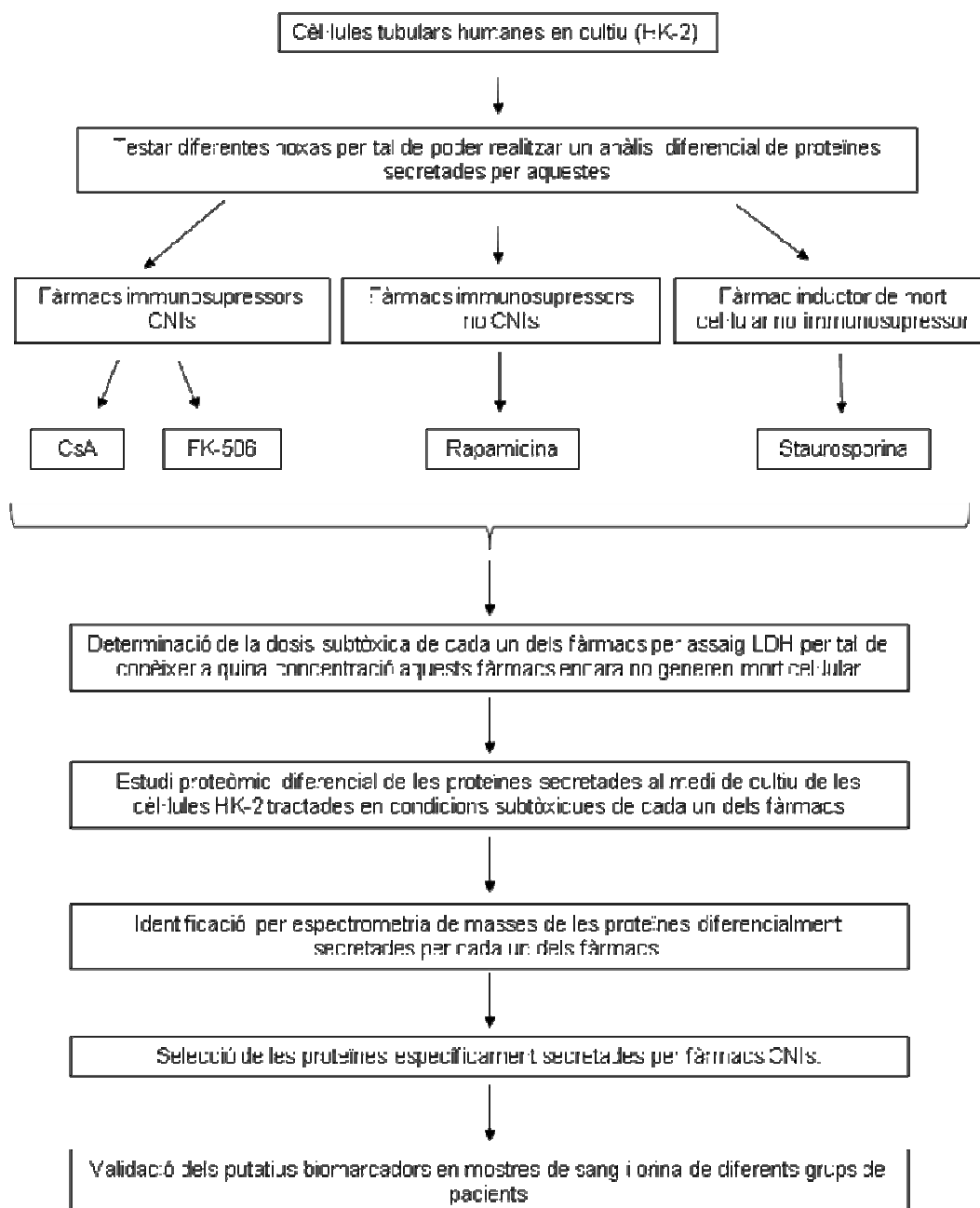
El disseny experimental global és el que es mostra en l'algoritme següent:



Es pretén detectar proteïnes secretades específicament per fàrmacs CNIs per cèl·lules derivades de túbul proximal humà (HK-2) sotmeses a tractament pretòxic de d'aquests fàrmacs mitjançant electroforesi bidimensional dels medis de cultius seguit d'identificació d'aquestes per espectrofotometria de masses. Es volen evitar dosis tòxiques per dues raons. En primer lloc, per assegurar que s'identifiquen proteïnes específicament secretades pels fàrmacs utilitzats i no com a resultat de la mort cel·lular on es produeix alliberament massiu de proteïnes al medi extracel·lular. En segon lloc, per poder identificar proteïnes secretades de forma primerenca per efecte dels fàrmacs anticalcineurínics que, hipotèticament, podrien ser útils com a biomarcadors precoços de nefrotoxicitat per CNIs.

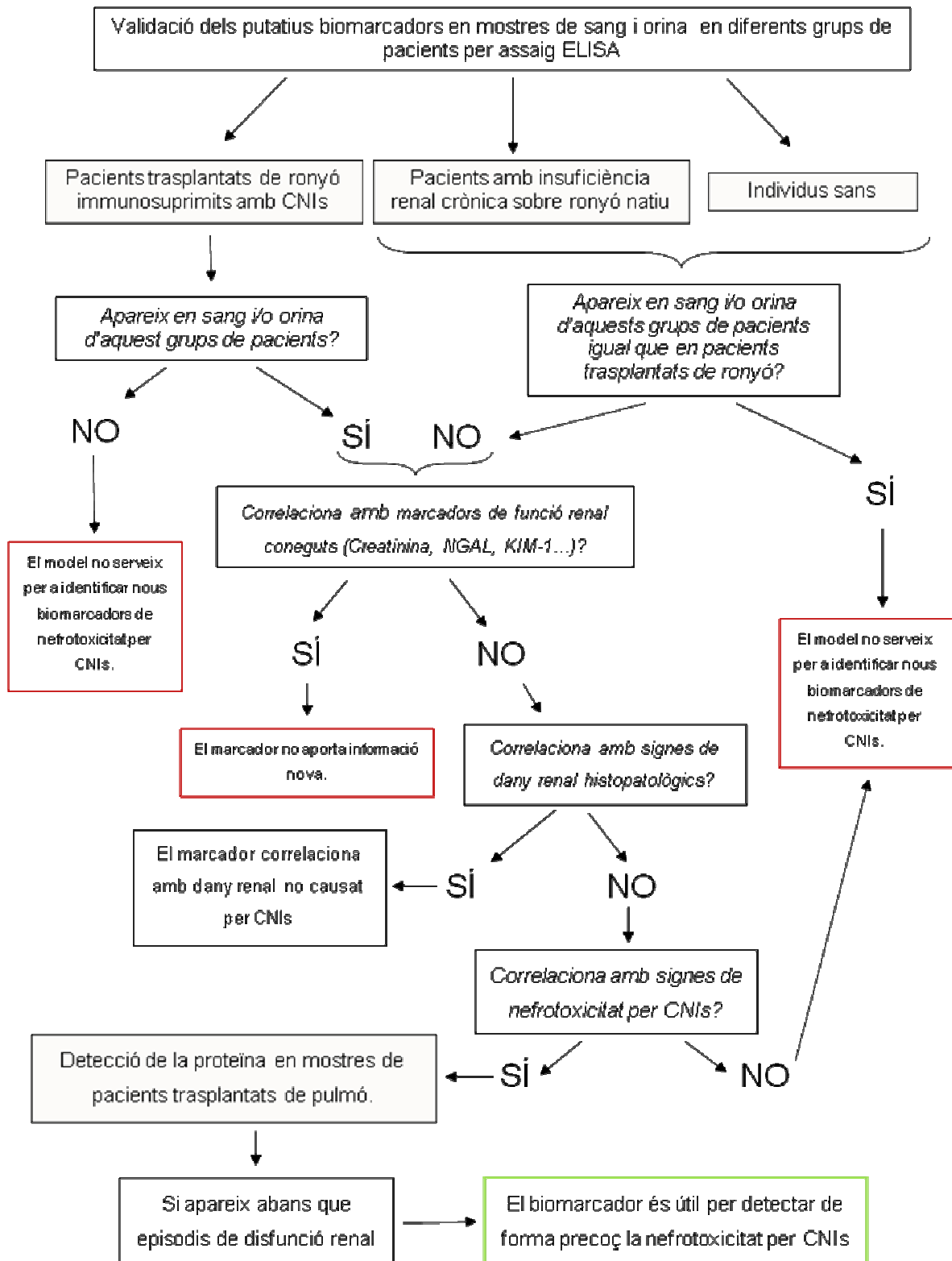
Els mapes proteòmics o secretomes obtinguts en les diferents condicions experimentals es compararan amb el secretoma de les cèl·lules HK-2 sense tractar per tal de detectar proteïnes diferencialment secretades que s'identificaran per espectrometria de masses. A més dels fàrmacs immunosupressors CNIs, es testarán altres productes per tal de descartar aquelles proteïnes secretades per d'altres tipus de fàrmacs immunosupressors o secretades per efecte de processos de mort cel·lular inespecífica. A tal efecte, s'inclourá en l'estudi la Rapamicina, fàrmac immunosupressor no CNI, i la Staurosporina, un inductor d'apoptosi sobre aquest tipus cel·lular¹³⁴.

El disseny experimental concret d'aquesta part es troba esquematitzat en el següent algorisme:



Un cop identificades aquestes proteïnes, s'avaluarà la seva aparició o no en plasma i orina per assaig ELISA de pacients trasplantats de ronyó i de pulmó sota règim immunosupressor anticalcineurínic. En cas que la proteïna aparegui en orina i/o plasma de pacients trasplantats caldrà comprovar que correlaciona amb disfunció renal per CNIs.

El disseny experimental concret d'aquesta segona part es troba esquematitzat en el següent algoritme:



2. CULTIUS CEL·LULARS

2.1. LÍNIA CEL·LULAR

S'ha utilitzat la línia cel·lular immortalitzada HK-2 derivada de ronyó humà (American Culture Collection (ATCC), nº catàleg CRL-2190). Aquesta línia cel·lular es va obtenir per transducció dels gens E6/E7 del virus del papil·loma humà 16 (HPV16) en cèl·lules tubulars proximals humanes. Són cèl·lules adherents, creixen formant monocapes i mostren fenotip de cèl·lula tubular ben diferenciada tant a nivell bioquímic com funcional¹³⁵.

2.2. CONDICIONS DE CULTIU

Les cèl·lules HK-2 es van cultivar en medi DMEM:Ham's F12 (1:1) enriquit amb sèrum fetal boví descomplementat (mitjançant incubació a 60 °C durant 30 minuts) i hormones i factors de creixement (veure Taula 1). La línia es va mantenir i expandir a 37 °C en una atmosfera saturada d'humitat i 5 % de CO₂. S'han seguit sempre les pràctiques estàndards i condicions d'esterilitat requerides pel treball amb cultius cel·lulars.

Taula 1. Composició medi del cultiu per cèl·lules HK-2.

Component	Concentració	Referència
DMEM	50% (v/v)	Life technologies (11880-036)
Ham's F12	50% (v/v)	Life technologies (31765-068)
HEPES	20 mM	Biological Industries (03-025-1B)
L-Glutamina	2 mM	Biological industries (03-020-1B)
D-(+)-Glucosa	12.5 mM	Sigma Aldrich (G-7021)
Apo-transferrina	5 µg/ml	Sigma Aldrich (T-8027)
Insulina	5 µg/ml	Sigma Aldrich (I-6634)
Dexametasona	5 x 10 ⁻⁸ M	Sigma Aldrich (D-8893)
T3	10 ⁻⁹ M	Sigma Aldrich (T-5516)
EGF	10 ng/ml	Sigma Aldrich (E-4127)

Component	Concentració	Referència
Selenat de sodi	60 nM	Sigma Aldrich (S-9133)
Sèrum fetal boví (FBS)	2% (v/v)	Biological industries (04-007-1A)
Antibiòtic-antimicòtic	1% (v/v)	Life technologies (15240-062)

2.3. MANTENIMENT I TRIPSINITZACIÓ DE CÈL·LULES HK-2

La línia cel·lular HK-2 requereix un canvi del medi cada 2 dies i es sol tripsinitzar cada 4 dies, quan assoleixen un 80-90 % de confluència, seguint el següent protocol:

- Reactius:**
- Tripsina-EDTA (Biological Industries. 03-053-1).
 - PBS 1x (Taula 17) estèril.
 - Medi de cultiu per cèl·lules HK-2 (Taula 1).

- Procediment:**
- Temperar els reactius a 37 °C.
 - Aspirar el medi amb una pipeta *pasteur* estèril.
 - Rentar les cèl·lules amb PBS 1x estèril.
 - Aspirar el PBS 1x i afegir tripsina (2 ml per cada 75 cm² de superfície).
 - Incubar 1-3 minuts a 37 °C (fins que les cèl·lules s'hagin desenganxat).
 - Resuspendre les cèl·lules tot afegint 8 ml de medi de cultiu.
 - Centrifugar les cèl·lules a 1500 rpm durant 5 minuts a temperatura ambient.
 - Aspirar el sobrenedant i resuspendre el *pellet* cel·lular en 1 ml de medi.
 - Sembrar les cèl·lules en una nova placa a la dilució desitjada (habitualment s'utilitza una dilució 1:5 per realitzar un passatge cada 4 dies)

2.4. RECOMPTE DE CÈL·LULES I SEMBRA

Per tal de sembrar la quantitat desitjada de cèl·lules per realitzar els experiments es van comptar i sembrar les cèl·lules utilitzant el següent protocol:

- Reactius:**
- Blau de Tripà (Sigma Aldrich, T-8154).
 - PBS 1x (Taula 17).
 - Cambra de *Neubauer* i microscopi òptic.

- Procediment:**
- Tripsinitzar les cèl·lules de la mateixa manera que en l'apartat 2.3.
 - Preparar una dilució 1:5 de la suspensió cel·lular en blau de Tripà (50 µl blau Tripà + 150 µl PBS 1x + 50 µl suspensió cel·lular).
 - Omplir la cambra de *Neubauer* amb 10 µl de la dilució i realitzar el comptatge de cèl·lules viables (no tenyides) en els diferents camps.
 - Realitzar el següent càlcul:

$$\text{N}^\circ \text{ cèl·lules/ml} = \text{N}^\circ \text{ cèl·lules promig} \times \text{factor de dilució} \times 10^4$$

- Calcular el volum necessari de suspensió cel·lular per sembrar la densitat cel·lular desitjada.
- Incubar a 37 °C (5 % CO₂) fins a la realització de cada experiment.

Per realitzar els experiments es van sembrar les cèl·lules HK-2 de passatge comprès entre 4 i 15 a una densitat de 0.15×10^6 cèl·lules/ml en els volums adients per cada tipus de placa que es troben resumits a la Taula 2.

Taula 2. Volums de sembra adients per cada tipus de placa.

Placa	Volum (ml)	Superfície (cm ²)	Referència
96 pous	0.075	0.335	TPP (92096)
24 pous	0.4	1.9	Nunc (143982)
12 pous	0.8	3.5	Nunc (150628)
6 pous	2	9.6	Nunc (140675)
100 mm Ø	13	60.1	TPP (93100)
150 mm Ø	30	147.8	TPP (93150)

2.5. TRACTAMENTS DE CÈL·LULES HK-2

Les cèl·lules es van tractar amb diferents compostos que es troben detallats a la Taula 3. Tots els tractaments es van realitzar a 36 hores postsembra, moment en que les cèl·lules sembrades arriben a confluència, i en medi sense FBS ja que, aquest interfereix en la correcta resolució de l'electroforesi bidimensional. Prèviament al tractament les cèl·lules es van rentar amb PBS 1x per tal d'eliminar la totalitat del FBS. La majoria de tractaments tingueren una durada de 24 hores, amb alguna excepció que s'especificarà al capítol de resultats. Les cèl·lules control van ser tractades amb el vehicle de dilució de cada fàrmac. Els volums de medi que es van utilitzar per als diferents tractaments varia segons la placa emprada (veure Taula 4).

Taula 3. Efecte i rang de dosis dels compostos utilitzats en els tractaments a cèl·lules HK-2.

Compost	Efecte	Rang de dosis usat	Proveïdor
Ciclosporina A (CsA)	Inhibidor de la fosfatasa calcineurina	0 a 20 μ M	Calbiochem® (239835)
FK-506	Inhibidor de la fosfatasa calcineurina	0 a 50 μ M	Cedit per Astellas Pharma
Rapamicina	Inhibidor de la quinasa mTOR	0 a 500 nM	Calbiochem® (553210)
Staurosporina	Inductor d'apoptosi	0 a 1000 nM	Sigma Aldrich (S-4400)
PMA	Ester de forbol, activador de la PKC	25 ng/ml	Sigma Aldrich (P-1585)

Taula 4. Volum de medi emprat durant els tractaments segons el tipus de placa.

Placa	Volum (ml)	Proveïdor
96 pous	0.1	TPP (92096)
24 pous	0.5	Nunc (143982)
12 pous	1	Nunc (150628)
6 pous	2	Nunc (140675)
100 mm Ø	10	TPP (93100)

3. ESTUDI DE LA TOXICITAT CEL·LULAR

Per tal d'avaluar la citotoxicitat produïda pels compostos CsA, FK-506, Rapamicina i Staurosporina es van realitzar assajos d'activitat LDH (lactat deshidrogenasa). L'assaig LDH és un sistema colorimètric que es basa en la mesura de l'activitat de la lactat deshidrogenasa (LDH) alliberada al medi de cultiu per permeabilització de la membrana de cèl·lules malmeses. L'activitat LDH es determina mitjançant un test enzimàtic que consta de 2 passos. En el primer pas el NAD^+ es redueix a NADH/H^+ per la conversió de lactat a piruvat catalitzada per la LDH. En el segon pas el catalitzador (*diaphorase*) transfereix el H/H^+ de NADH/H^+ cap a la sal de tetrazoli (clorur de iodotetrazoli, INT, groc pàl·lid) que es redueix a sals de formazan (vermell). L'augment de sals de formazan correlaciona amb l'increment de LDH alliberat per les cèl·lules que tenen la membrana malmesa. Els assajos LDH es van realitzar atenent al protocol següent:

Reactius: - *Cytotoxicity detection Kit*^{plus} (LDH) (Roche, 04744926001)

- PBS 1x (Taula 17)

- PBS 1x amb 0.4% (v/v) Tritó X-100 (Sigma Aldrich, T-8787)

- Lector de plaques ELISA (Anthos, HT II)

Procediment: - Sembrar les cèl·lules HK-2 en plaques de 24 pous (3 rèpliques per condició) tal i com s'indica en l'apartat 2.4. i es van tractar de la forma descrita en l'apartat 2.5.

- Un cop finalitzat el tractament, es recull el medi de cultiu i es centrifuga 5 minuts a 7000 rpm (4°C). Recollir el sobrenedant i es posar-lo en un tub nou.

- Rentar la placa amb PBS 1x i llisar les cèl·lules adherides amb 500 µl de PBS 1x-Tritó 0.4 % durant 45 minuts a 37 °C.

- Recollir el lisat cel·lular i centrifugar a 14.000 rpm durant 5 minuts (4 °C).

- Recol·lectar el sobrenedant i posar-lo en un tub nou.

- Pipetejar per duplicat 75 µl de cada rèplica, tant del medi de cultiu com del llisat cel·lular, en una placa de 96 pous.

- Realitzar la reacció de LDH tot seguint les instruccions del Kit però ajustant els

volums de reacció a 75 µl.

- Llegir l'absorbància en un lector de plaques ELISA a una longitud d'ona de 490 nm.

- Calcular el % de LDH alliberat (*LDH release*):

$$\% \text{ LDH release} = (\text{Abs } 490 \text{ nm medi} / \text{Abs } 490 \text{ nm medi} + \text{Abs } 490 \text{ nm lisat}) \times 100$$

4. ANÀLISI DE PROTEÏNES

4.1. RECOLLIDA DE MEDIS CEL·LULARS

Un cop tractades les cèl·lules de la forma descrita en l'apartat 2.5., es van recollir els medis i es van centrifugar a 1500 rpm durant 5 minuts a 4°C per tal d'eliminar residus cel·lulars. Depenent del mètode d'anàlisi proteic utilitzat es va processar el sobrenedant de diferent manera:

4.1.1. Anàlisi per Western Blot

Per a anàlisi per Western Blot (apartat 4.3.) es va mesclar el sobrenedant amb tampó reductor Laemmli 5x (veure Taula 18) en una proporció 4 parts de medi per 1 part de tampó i es va conservar a -20 °C. No es van quantificar els nivells de proteïna ja que es va utilitzar sempre el mateix volum de medi per la realització del Western Blot assumint que les proteïnes presents en la mostra de medi de cultiu provenien del mateix nombre de cèl·lules.

4.1.2. Anàlisi per Electroforesi Bidimensional

Per a realitzar l'anàlisi per electroforesi bidimensional (apartat 4.4.) el sobrenedant es va concentrar per centrifugació i es va rentar amb urea 8 M per tal d'eliminar les sals contingudes en el medi. Es van utilitzar filtres de 3 kDa de tall per tal de poder obtenir el contingut proteic superior a 3 kDa concentrat i eliminar les proteïnes més petites. Es va seguir el següent protocol:

- Filtres i reactius:**
- Filtres de 3 kDa de tall (Merck-millipore, UFC900324 i UFC500396).
 - Urea 8 M (GE Healthcare, 17-1319-01).

- Centrífuga (Thermo Br4i) i centrífuga de sobretaula (Eppendorf, 5415R).
- Pierce ® BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, 23225).

- Procediment:**
- El sobrenedant es concentra 200 vegades per centrifugació (de 10 ml a 50 µl) utilitzant de forma seqüencial els filtres de 3 kDa UFC900324 i UFC500396 tot seguint les instruccions del fabricant. Els passos de concentració es duen a terme a 4 °C.
 - Un cop reduït el volum de medi a 50 µl s'afegeix al segon filtre 500 µl d'urea 8 M i es concentra de nou per centrifugació a temperatura ambient per tal que la urea no precipiti. Aquest pas es repeteix 3 vegades. El volum final és de 50 µl.
 - Recollir el medi concentrat i rentat, i mesurar la quantitat de proteïna d'una dilució 1:2 en H₂O MilliQ™ mitjançant el mètode BCA seguint les instruccions del fabricant per lectura en placa de 96 pous.
 - Conservar a 4 °C.

4.2. EXTRACCIÓ DE PROTEÏNES DE CULTIUS CEL·LULARS

Els extractes proteics derivats de cultiu cel·lular es van realitzar seguint el protocol següent:

- Reactius:**
- PBS 1x (Taula 17) fred (4 °C)
 - Tampó de lisi (Taula 19).
 - Tampó de mostra reductor Laemmli 5x (Taula 18).
 - Gel i neu carbònica.
 - *Scrapers*.
 - Centrífuga de sobretaula (Eppendorf, 5415R).
 - Pierce ® BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, 23225)

- Procediment:**
- Aspirar el medi de cultius i rentar les cèl·lules amb PBS1x fred.

* Si l'extracte no es fa el mateix dia congelar immediatament les plaques usant neu carbònica i guardar-les a -80 °C.

- Posar la placa sobre gel i afegir tampó de lisi (28.5 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ de pou).
- Incubar sobre el gel durant 15 minuts.
- Refredar tubs *ependorf* en gel, un per cada pou.
- Rascar els pous amb l'ajuda d'un *scraper* i recollir la totalitat de la mostra dins un tub *ependorf* prèviament refredat.
- Centrifugar a 13000 rpm durant 15 minuts (4 °C).
- Quantificar la quantitat de proteïna present en el sobrenedant mitjançant el mètode de BCA seguint les instruccions del fabricant per lectura en placa de 96 pous.
- Recollir el sobrenedant i mesclar amb tampó de mostra reductor Laemmli 5x en una proporció 4 parts d'extracte cel·lular per 1 part de tampó Laemmli 5x.
- Guardar a -20 °C.

4.3. SDS-PAGE D'UNA DIMENSIÓ I WESTERN BLOT (WB)

L'electroforesi en gels de poliacrilamida (PAGE) és una de les tècniques més usades per separar i caracteritzar proteïnes. La xarxa formada per la barreja acrilamida/bis-acrilamida polimeritzada permet separar les proteïnes segons la seva càrrega, forma i mida quan es sotmeten a un camp elèctric. L' SDS-PAGE d'una dimensió permet separar les proteïnes exclusivament pel seu pes molecular. El detergent SDS, al constar d'un cap aniónic i una cua lipofílica, desnatura les proteïnes de manera que es perd la seva estructura tridimensional donant lloc a proteïnes lineals. A més, l' SDS s'uneix de forma no covalent a les proteïnes en una ratio SDS:aminoàcids de 1:2 que confereix a la proteïna una càrrega neta negativa proporcional a la seva mida. Les proteïnes separades per SDS-PAGE es poden electrotransferir a una membrana que permetrà la detecció de la proteïna d'interès mitjançant anticossos i un sistema de revelat adequat.

Per a la realització d'anàlisi per SDS-PAGE seguit de *Western blot* tant d'extractes cel·lulars (apartat 4.2.) i medis de cultiu (apartat 4.1.) com de mostres d'exosomes extrets d'orina humana (apartat 5.2.2.) es van correr en gels de poliacrilamida (SDS-PAGE d'una dimensió). Les concentracions d'acrilamida dels

gels es van determinar en funció de la mida de la proteïna a detectar (Taula 5). Seguidament, les mostres resoltes en els gels de poliacrilamida es van transferir mitjançant *Western blotting* (WB) a membranes de PVDF per tal de detectar les proteïnes detallades a la Taula 7. Es va seguir el protocol següent:

- Reactius:**
- Gels de poliacrilamida (Taula 6).
 - Sistema mini-*PROTEAN* 3 (Bio-Rad).
 - Fonts d'electroforesi (Bio-Rad).
 - Tampó d'electroforesi 1x (Taula 20).
 - Tampó de transferència Towbin 1x (Taula 20).
 - Metanol
 - H₂O MilliQ™
 - Membranes de PVDF (Westran® S. Whatman, 10413096)
 - Llet en pols descremada *Central Lechera Asturiana*.
 - PBS 1x (Taula 17) amb 0,1 % (v/v) de Tween 20.
 - Anticossos primaris i secundaris (Taula 7).
 - Sistema de revelat Luminata classico, crescendo o forte (Merck-millipore, WBLUC0500, WBLUR0500 i WBLUF0500, respectivament).
 - Films de raigs X de sensibilitat normal (Agfa HealthCare, EA78W) i d'alta sensibilitat (GE Healthcare, 28906837)
 - Reveladora FujiFilm-100A.

- Procediment:**
- Bullir la mostra proteica en tampó de càrrega reductor (95-100 °C) durant 5 minuts. Realitzar una centrifugació curta.
 - Realitzar els gel d'acrilamida segons la mida de la proteïna que vulguem detectar (Taula 5 i 6).
 - Muntar el gels en la cubeta d'electroforesi seguint les instruccions del fabricant i cobrir-los de tampó d'electroforesi 1x.
 - Carregar les mostres en els gels d'acrilamida. Es carrega menys o més proteïna

en funció la eficiència de l'anticòs (veure Taula 7).

- Correr a 100 V fins que el front arriba al gel separador i a 200 V fins que el front surt del gel.
- Desmuntar els gels i transferir les proteïnes a una membrana de PVDF prèviament submergida breument amb metanol. La transferència es fa a 100 V durant 1 h en tampó de transferència Towbin 1x amb 20 % de metanol.
- Bloquejar les membranes amb llet desnatada al 5 % (dissolta en PBS 1x - 0.1 % Tween 20) durant 1 h a temperatura ambient en agitació.
- Incubació amb l'anticòs primari desitjat diluït en solució de bloqueig a 4 °C ON.
- Realitzar 3 rentats amb PBS1x - 0.1 % Tween 20 de 10 minuts en agitació.
- Incubació amb l'anticòs secundari en solució de bloqueig a temperatura ambient durant 1 h en agitació.
- Realitzar 3 rentats amb PBS 1x - 0.1 % Tween 20 de 10 minuts en agitació.
- Revelar amb "Luminata Classico", "Crescendo" o "Forte" depenent de l'anticòs utilitzat (Taula 7) seguint les especificacions recomanades per la casa comercial.
- Exposar el film de raigs X el temps necessari (en fosc) per visualitzar les bandes i revelar-lo utilitzant màquines reveladores.
- Digitalitzar i analitzar els films (apartat 4.6.1.).

Taula 5. Concentració de poliacrilamida usada en els gels segons la mida de la proteïna a detectar.

Mida (kDa)	% Acrilamida
10-30	15
30-100	12
>100	7.5

Taula 6. Composició per a dos gels de poliacrilamida d'1.5 mm de gruix.

	SEPARADOR (Concentració final acrilamida,%)			APILADOR
	7.5	12	15	
30% Acryl/ 0.8 %bis (ml)	3.75	6	7.5	0.65
4x Tris/SDS pH 8.8 (ml) (composició Taula 21)	3.75	3.75	3.75	1.25 (4x Tris/SDS pH 6.8, composició Taula 21)
H ₂ O MilliQ™ (ml)	7.5	5.25	3.75	3.05
Persulfat Amònic 10 % (μl)*	150	150	150	50
TEMED (μl)*	15	15	15	5

* El persulfat amònic i el TEMED s'afegeixen al final ja que promouen la polimerització dels gels de poliacrilamida.

Taula 7. Anticossos utilitzats per la immunodetecció per *Western Blot*.

	Anticòs	Proveïdor	Quantitat de proteïna (segons mostra)	Concentració d'ús	Sistema de revelat
Primaris	anti-Fascina-1	Sigma Aldrich (HPA005723)	Medi de cultiu, 35 µl	1:500	Luminata Crescendo
			Extracte cel·lular, 5 µg		Luminata Classico
			Exosomes, 20 µl		Luminata Forte
	anti-ERK1/2 total	Millipore (06-182)	Extracte cel·lular, 5 µg	1:1500	Luminata Classico
	anti-ERK1/2 fosforilat	Cell signaling (9106S)	Extracte cel·lular, 5 µg	1:1000 (diluït en BSA 5 %)	Luminata Classico
	anti-Ciclofilina B	Affinity Bioreagents (PA1-027)	Medi de cultiu, 35 µl	1:2000	Luminata Classico
Extracte cel·lular, 5 µg					
Anti-TSG-101	AbCam (Ab83)	Exosomes, 5-10 µl	1:500	Luminata Forte	
Secundaris	anti-rabbit	DAKO (P0448)	--	1:5000	--
	anti-mouse	DAKO (P0260)	--	1:5000	--
	anti-goat	DAKO (P0449)	--	1:5000	--

4.4. ELECTROFORESI BIDIMENSIONAL (2D)

Es va realitzar un anàlisi diferencial de les proteïnes presents en el medi de cèl·lules HK-2 sotmeses a diferents tractaments (CsA, FK506, Staurosporina i sense tractar) per electroforesis bidimensional.

L'electroforesi bidimensional és una tècnica d'alta resolució que permet separar proteïnes presents en mescles proteiques complexes i consta de dues etapes. La primera es basa en la separació de les proteïnes segons el seu punt isoelèctric, seguida d'una segona etapa on les proteïnes es separen segons el seu pes molecular mitjançant SDS-PAGE. Les proteïnes presents es poden identificar posteriorment mitjançant espectrometria de masses.

4.4.1. Primera etapa: Isoelectroenfoc (IEF) o primera dimensió.

L'isoelectroenfoc o separació per punt isoelèctric es basa en el moviment de les proteïnes en un medi on s'aplica un gradient de pH. Quan s'aplica una diferencia de potencial en un gradient de pH on s'hi troba la mescla de proteïnes, aquestes migraran fins al punt on el pH sigui igual al seu pI. El protocol emprat va ser el següent:

- Reactius:**
- Tires de rang de pH 3-11 de 7 cm (GE Healthcare, 17-6003-73)
 - Solució de rehidratació (Taula 22).
 - DTT.
 - Amfòlits: *IPG ampholine buffer* pH 3–11 (GE Healthcare, 17-6004-40)
 - HED, *hydroxiethyl disulfide* (DeStreak, GE Healthcare, 17-6003-18)
 - *DryStrip Cover Fluid* (Plusone, 17-1335-01)
 - *Strip Holder* de ceràmica i IPGphor (Pharmacia Biotech).

- Procediment:**
- Afegir DTT (0.28 %, w/v) i els amfòlits (0.5 %, v/v) al tampó de rehidratació. El DTT s'afegeix com a desnaturalitzant de proteïnes i els amfòlits per crear el gradient de pH en el que es desitgi realitzar l'IEF.
 - Preparar les mostres de proteïna diluint-les en solució de rehidratació (60 µg de proteïna en 125 µL de volum final).

- Afegir 1.5 µL de *DeStreak* i vortexar la mostra. El reactiu *DeStreak* s'utilitza per promoure la oxidació dels grups tiol de les proteïnes especialment a rangs de pH superiors a 7.
- Aplicar la totalitat de la mostra proteica al *Strip Holder* tot evitant la formació de bombolles.
- Col·locar amb cura la tira sobre la suspensió proteica, amb la cara que conté el gel de poliacrilamida cap per avall.
- Aplicar unes gotes de *DryStrip Cover Fluid* fins a cobrir la tira per evitar l'evaporació. Tapar l'*Strip Holder* i col·locar-lo a l'aparell IPGphor per realitzar l'IEF.
- Rehidratació. La rehidratació ha de ser d'un mínim 12 hores i té dues etapes:
 - 1) 6 h + x h (ajustar "x" en funció de l'hora que desitgem acabar l'IEF) a 50 µA per tira a 20 °C.
 - 2) 4 h de rehidratació activa a 30 V.
- Un cop finalitzada la rehidratació es realitza l'enfoc. Per a cada tira de 7 cm aplicar seqüencialment:
 - 1) 30 min a 300 V
 - 2) 30 min a 1000 V
 - 3) 1 h a 5000 V
 - 4) 5 h a 5000 V
- Un cop realitzat l'IEF, ja es pot passar a realitzar l'SDS-PAGE o bé guardar les tires en tubs tancats a -20 °C.

4.4.2. Segona etapa: SDS-PAGE o Segona Dimensió

Les proteïnes prèviament separades segons el seu punt isoelèctric es separen en aquesta etapa en funció de la seva mida molecular per SDS-PAGE, tal i com s'ha explicat a l'apartat 3.3. S'ha utilitzat el sistema de tampons Tris-Tricina durant l'SDS-PAGE ja que permet una millor resolució de les proteïnes de baix pes molecular¹³⁶. El protocol que es va utilitzar és el que segueix:

Reactius: - Solució d'equilibrat reductora (amb DTT)*

- Solució d'equilibrat alquiladora (amb Iodocetimida)*
- Gels de poliacrilamida al 12 % (Taula 8).
- Tampó anòdic 1x del sistema de tampons Tris-Tricina.*
- Tampó catòdic 1x del sistema de tampons Tris-Tricina.*
- Solució de sellat (Agarosa, 0.5 % (w/v)).*
- Sistema mini-*PROTEAN* 3 (Bio-Rad).
- Fonts d'electroforesi (Bio-Rad).

*La composició dels tampons es troba detallada a la Taula 22 de l'annex de materials i mètodes.

Procediment:

- Preparació del gels.
- Després de l'IEF, equilibrar les tires: 10 minuts amb solució d'equilibrat reductora seguits de 10 minuts amb solució d'equilibrat alquiladora. En agitació.
- Col·locar les tires sobre el gel SDS-PAGE de manera que la cara de la tira que conté el gel de poliacrilamida miri a l'operador i l'ànode (extrem arrodonit) quedi a l'esquerra de l'operador. Amb l'ajuda d'una espàtula empènyer la tira cap al gel evitant la formació de bombolles. Segellar el sistema amb agarosa 0.5 % prèviament escalfada a 60 °C.
- Muntar els gels en la cubeta d'electroforesi i omplir la cambra superior amb tampó catòdic 1x i la cubeta o cambra inferior amb tampó anòdic 1x.
- Resoldre les mostres: per a tira de 7 cm aplicar 30 V durant 10 minuts seguits de 200 V durant 1 hora.
- Desmuntar els gels i tenyir amb una tinció compatible amb la posterior identificació per MALDI-TOF, en aquest cas s'ha utilitzat Coomassie Col·loïdal (veure apartat 4.5.).
- Analitzar i processar les imatges dels gels (veure apartat 4.6.2)
- Anàlisi per MALDI-TOF de les proteïnes diferencialment expressades amb l'aparell Ultraflex TOF-TOF de Bruker Daltonics (realitzat a la Unitat de Proteòmica, Institut de Recerca de l'Hospital Universitari de la Vall d'Hebrón).

Taula 8. Composició dels gels d'acrilamida d'1mm de gruix per a tira de 7 cm.

	SEPARADOR 12.5 %	Comentaris
30% Acryl / 0.8 %bis	10.4 ml	Persulfat amònic i TEMED s'afegeixen al final ja que promouen la polimerització.
Tampó de gelificació 3x	8.3 ml	
H2O MilliQ™	6 ml	
SDS 10% (w/v)	0.25 ml	
Persulfat amònic	12.5 mg	
TEMED	12.5 µl	

4.5. TINCIÓ DE PROTEÏNES AMB COMASSIE COL-LOIDAL

La tinció amb coomassie blau brillant permet visualitzar proteïnes resoltes en gels de poliacrilamida. Existeixen dues variants de coomassie blau brillant: R-250 (més vermella en solució, no apta per la tinció col-loidal) i G-250 (més verda en solució, apta per la tinció col-loidal). Aquests es diferencien per la presència de 2 grups metil més en el G-250 respecte el R-250.

Ambdós tipus de coomassie blau brillant són compatibles amb la identificació de proteïnes per espectrometria de masses però s'ha realitzat tinció amb coomassie blau brillant G-250. El protocol que es va seguir és que optimitzà Giovanni Candiano¹³⁷, breument:

Reactius:

- Solució fixadora per coomassie col-loïdal (Taula 23)
- Coomassie col-loïdal "*Blue Silver*" (Taula 23)

Procediment:

- Fixar els gels en agitació durant una hora amb solució fixadora.
- Tenyir amb coomassie col-loïdal "*Blue Silver*" en agitació entre 12 h i 4 dies (en aquest treball els gels s'han tenyit durant aproximadament 24 h).
- Destenyir amb H₂O MilliQ™ fent 3 rentats de 20 min en agitació o fins a desaparició del *background*.

4.6. ANÀLISI I PROCESSAT D'IMATGES

4.6.1 Anàlisi i processat de pel·lícules de raigs X

Les pel·lícules de raigs X es van escanejar utilitzant l'escàner calibrat GS-800 (Bio-Rad) i les bandes específiques es van densitometrar utilitzant el *software* específic *Quantity One* de Bio-Rad seguint les indicacions del manual d'ús del *software* per a anàlisi de bandes.

4.6.2. Anàlisi i processat dels gels bidimensionals

Per tal d'identificar les proteïnes diferencialment secretades per CsA, FK506 i Staurosporina respecte al control no tractat es van analitzar els mapes proteòmics obtinguts per electroforesi bidimensional utilitzant el *software* específic *PD-Quest* de Bio-Rad. Es van seguir els següents passos:

- a. Digitalització dels gels en un escàner calibrat (*GS-800 calibrated densitometer*, Bio-rad).
- b. Intensificació de la imatge i neteja del soroll de fons.
- c. Identificació dels *spots* reals i modelització.
- d. Quantificació i *matching* entre els *spots* de diferents gels.
- e. Comparació quantitativa de les intensitats entre *spots* en diferents condicions mitjançant un test "t" normalitzat per la intensitat del total de taques.

Tots els passos van ser corregits i validats sota la supervisió d'un expert en aquests tipus d'anàlisi (Dr. Joan López Hellín) i seguint el manual d'ús del *software*. Es varen seleccionar per identificar mitjançant espectrometria de masses les proteïnes que incrementen la seva secreció respecte al control.

4.7. ASSAJOS ELISA

Els assajos ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) que es van utilitzar es basen en la detecció d'un antigen immobilitzat sobre una fase sòlida mitjançant anticossos, la unió dels quals produirà directa o indirectament una reacció, el producte de la qual pot ser mesurat per espectrofotometria. Aquesta tècnica a part de ser robusta, versàtil i de simple realització té l'avantatge de ser una tècnica quantitativa, és a dir permet establir la concentració d'una determinada proteïna en una mostra concreta.

Es van analitzar utilitzant ELISA comercials les proteïnes detallades a la taula 9, en plasma i/o orina concentrada de pacients trasplantats de ronyó i/o de pulmó. Els ELISA es van realitzar seguint les indicacions dels fabricants utilitzant l'autoanalitzador Triturus® (Biomedical Diagnostics) del Servei de Bioquímica de l'Hospital de la Vall d'Hebrón, exceptuant les dilucions i el pipeteig de les mostres a les plaques d'ELISA que es van realitzar manualment. Les dilucions prèvies de les orines concentrades es van fer en H₂O MilliQ™. L'ajust de la corba de calibrat es va calcular per 4 paràmetres lineals (4PL) en tots els casos.

Les concentracions de cada proteïna resultats dels assajos ELISA en orina s'han expressat respecte als nivells de creatinina urinària (µg proteïna/g creatinina), molècula que varia poc la seva concentració en orina. La determinació dels nivells de creatinina de les mostres d'orina es va realitzar per reacció de *Jaffe* (Olympus AU5400) al Servei de Bioquímica de l'Hospital Vall d'Hebrón.

Taula 9. Kits ELISA utilitzats, mostres assajades, dilucions de les mostres i temps d'incubació del substrat en cada cas.

Kit	Mostres	Dilució prèvia	Dilució requerida pel Kit	Temps d'incubació del substrat
PAI-1 human ELISA Kit (KHC3071, Invitrogen)	Orina concentrada	1:2	1:2	22 minuts
	Plasma	NO	1:2	
Human TIM-1/KIM-1/HAVCR Immunoassay (DKM 100, R&D)	Orina concentrada	1:20	NO	30 minuts
NGAL ELISA Kit (KIT036, Bioporto)	Orina concentrada	1:20	1:500	10 minuts
ELISA kit for Fascin (E91757Hu, USCN Life Science Inc.)	Orina concentrada	1:100	NO	30 minuts
	Plasma	NO	NO	

5. OBTENCIÓ I PROCESSAT DE MOSTRES BIOLÒGIQUES

Les mostres d'orina i de sang obtingudes dels pacients detallats en l'apartat 6 es van processar de la següent forma:

5.1. PLASMA

Es van recollir 5 ml de sang de cada pacient en tubs amb EDTA (BD Vacutainer®, 367653), per evitar la coagulació. Es van centrifugar a 3000 rpm durant 10 minuts a temperatura ambient, es va recollir el sobrenedant (plasma) que es va conservar correctament etiquetat a -80 °C fins al moment de ser utilitzat.

5.2. ORINA

Es va recollir orina de la segona micció del matí en un pot de 100 ml estèril, depreciant el principi i el fi de la orina. Depenent de l'anàlisi posterior de les mostres d'orina es van processar de diferent forma:

5.2.1. Anàlisi per ELISA

Es van centrifugar 24 ml d'orina a 3000 rpm durant 10 minuts per eliminar restes cel·lulars que poguessin estar presents en la mostra. El sobrenedant es congela a -20 °C per tal que les sals precipitin, es descongela i es concentra per centrifugació fins a un volum final de 500-750 µl utilitzant filtres de 3 kDa de tall (Merckmillipore, UFC900324) seguint les instruccions del fabricant. L'orina concentrada degudament etiquetada es va conservar a -80 °C.

5.2.2. Aïllament d'exosomes

Els exosomes són vesícules de membrana de 20-100 nm que s'originen a partir de vesícules internes dels endosomes tardans o *multivesicular bodies* (MVBs) en diferents tipus cel·lulars. S'alliberen de les MVBs cap al medi extracel·lular per fusió de la membrana externa de les MVBs amb la membrana plasmàtica. S'han aïllat tant en medi de cultiu cel·lular com en plasma i orina raó per la qual es consideren una font de biomarcadors important¹²⁷.

Es va seguir el protocol desenvolupat per Pisitkun i Knepper¹²⁹, breument:

- Reactius:**
- Cocktail inhibidor de proteases (Sigma Aldrich, P8340)
 - Tubs aptes per ultracentrifugació de 12 ml (Beckman ultraclear, 344059)
 - Ultracentrífuga (Sorvall discovery 90SE)
 - Rotor per ultracentrífuga (TH-641 Sorvall, Kendro Laboratory products)
 - Tampó de càrrega reductor Laemmli 5x (Taula 18)

- Procediment:**
- S'afegeix cocktail inhibidor de proteases a una dilució 1:200.
 - Es refreda la orina a 4°C per promoure la precipitació de les sals.
 - Es col·loca la mostra en un tub de 12 ml per ultracentrífuga i s'introdueix en els

cubilets del rotor seguint les instruccions d'ús d'aquest.

- Es centrifuga a 17.000 g durant 15 min a 4 °C.
- Es recull el sobrenedant (descartar el *pellet*).
- Es centrifuga a 200.000 g durant 1 h a 4 °C.
- Descartar el sobrenedant i resuspendre el *pellet* en 50 µl de tampó de càrrega reductor 1x.
- Bullir la mostra a 100 °C durant 5 min. Conservar a -20 °C si no s'analitza de forma immediata.
- Validar per *Western blotting* (apartat 4.3.) la presència tant de marcadors d'exosoma (TSG-101, CD-81...) com de la proteïna d'interès.

6. PACIENTS

Les mostres biològiques de pacients es van obtenir sempre seguint les directrius del projecte PR(AG)12/2010 aprovat pel Comitè Ètic d'Investigació Clínica (CEIC) de l'Institut Recerca HUVH, informant als pacients de la realització de l'estudi i obtenint el consentiment informat. Es va seguir en tot moment la normativa nacional i europea sobre estudis clínics i protecció de dades de caràcter personal. Les dades dels pacients inclosos en l'estudi, tant demogràfiques com clíniques, es van introduir en una base de dades creada en Access (Microsoft Office).

Les anàlisis clíniques per determinar nivells de creatinina sèrica, proteïnúria i nivells sistèmics de fàrmacs anticalcineurínics (FK-506 o CsA) es van realitzar al Servei de Bioquímica de l'Hospital Vall d'Hebrón. La creatinina sèrica es va mesurar mitjançant la reacció de *Jaffe* i la proteïnúria pel mètode del Pirogalol, ambdós amb l'aparell Olympus AU5400. Els nivells de fàrmacs immunosupressors CNIs es van avaluar per assaig EMIT (*Enzyme Multiplied Immunoassay Technique*) amb l'aparell *Cobas Mira Plus*.

El mètode de mesura de la creatinina va ser descrit per *Jaffe* al 1886¹³⁸ i consisteix en la reacció de la creatinina amb ions picrat en un medi alcalí que

produeix un compost taronja-vermell. L'absorbància d'aquest compost a 490-510 nm es directament proporcional a la concentració de creatinina de la mostra.

El mètode del Pirogalol, la tècnica utilitzada per mesurar la concentració proteica de la orina, també és colorimètric. El vermell de Pirogalol es combina amb molibdat per formar un complex vermell amb una absorvència màxima a 470 nm. L'assaig es basa en el canvi d'absorvència que succeeix quan dit complex s'uneix als aminoàcids de les proteïnes que genera una compost blau-lila amb una absorvència màxima a 600 nm. L'absorbància d'aquest complex és directament proporcional a la quantitat de proteïna de la mostra.

Els grups de pacients que es van incloure a l'estudi són els que es detallen a continuació.

6.1. GRUP DE PACIENTS TRASPLANTATS DE RONYÓ

Es van recollir mostres d'orina i de plasma d'un total de 42 pacients trasplantats de ronyó just abans de la realització d'una biòpsia de l'empelt renal per indicació mèdica amb l'objectiu de poder relacionar la presència o absència de diferents proteïnes en sang o orina amb el diagnòstic histològic (Taula 9).

Taula 9. Criteris d'inclusió i exclusió a l'estudi del grup de pacients trasplantats de ronyó.

PACIENTS TRASPLANTATS DE RONYÓ	
Criteris d'inclusió	Criteris d'exclusió
<ul style="list-style-type: none"> - Trasplantats de ronyó indicats per a biòpsia de l'empelt renal (seguiment, deteriorament agut de la funció renal, deteriorament crònic de la funció renal o proteïnúria). - Majors de 18 anys. 	<ul style="list-style-type: none"> - Presència de tumors detectats. - Coagulopatïes o coagulació deficient.

Tots els pacients eren mantinguts amb immunosupressió basada en fàrmacs anticalcineurínics, amb FK-506 (n=38) o CsA (n=4), en alguns casos combinat amb

prednisona i/o MMF. La biòpsia es va realitzar en tots els casos per punció amb agulla de 16G amb el que s'obtenen cilindres de teixit renal que són processats i analitzats al servei d'Anatomia Patològica de l'Hospital Universitari Vall d'Hebrón. Les biòpsies es realitzaren per indicació mèdica de :

- a. Deteriorament agut o recuperació tardana de la funció renal post-transplantament: s'hi inclouen pacients amb funció renal alterada (atenent a variacions dels nivells de la creatinina sèrica) i amb menys de 18 mesos de transplantament.
- b. Proteïnúria o deteriorament crònic de la funció renal: s'hi inclouen pacients amb proteïnúria elevada (proteïnúria > 0.8 g/dia) i pacients amb més de 18 mesos post-transplantament amb disminució progressiva de la funció renal.
- c. Seguiment: s'hi inclouen pacients amb funció renal estable (MDRD-4 > 30 ml/min, proteïnúria < 0.8 g/dia) als 3 mesos post-transplantament.

Les dades demogràfiques i clíniques es troben recollides a la taula 10.

Taula 10. **Dades demogràfiques i paràmetres clínics dels pacients trasplantats de ronyó inclosos en l'estudi.** S'hi mostren de cada grup el nombre de pacients desglosat per sexes, l'edat, l'edat al trasplantament, el temps post-trasplantament, els nivells de creatinina sèrica, la proteïnúria i els nivells sistèmics d'immunosupressor CNI.

	Pacients trasplantats renals	Deteriorament agut o funció renal retardada	Proteïnúria o deteriorament crònic	Seguiment
N	42	12	11	19
N home/N dona	29/13	11/1	6/5	12/7
Edat (anys, mitjana ± SEM)	54.05 ± 2.52	57.2 ± 4.99	48.08 ± 5.13	55.51 ± 3.52
Edat al trasplantament (anys, mitjana ± SEM)	51.89 ± 2.79	55.76 ± 5.3	42.02 ± 6.07	55.16 ± 3.5
Temps post-trasplant (mesos, mitjana ± SEM)	25.83 ± 7.523	17.11 ± 9.28	72.6 ± 21.77	4.18 ± 0.57
Creatinina sèrica (mg/dl, mitjana ± SEM)	1.62 ± 0.007	2.12 ± 0.10	1.63 ± 0.14	1.29 ± 0.06
Proteïnúria (g/dia, mitjana ± SEM)	0.77 ± 0.18	0.65 ± 0.16	1.8 ± 0.58	0.23 ± 0.03
Immunosupressor (N FK506/N CsA)	38/4	10/2	10/1	19/1
FK506 (ng/mL, mitjana ± SEM)	9.4 ± 0.44	8.92 ± 0.87	8.31 ± 1.01	10.26 ± 0.55
CsA (ng/mL, mitjana ± SEM)	151.0 ± 60.58	181 ± 59	84	158

En totes les biòpsies, es va avaluar el grau de les lesions histològiques seguint els criteris de Banff ⁵⁶ que permeten obtenir diferents graus dels següents diagnòstics:

1. Normal: histologia normal.
2. Canvis mediats per anticossos o rebuig humoral: presència d'anticossos circulants anti-donador i presència de la proteïna del complement C4d (tinció per C4d positiva). En aquest cas es pot donar deposició de C4d sense evidències de rebuig, rebuig agut mediat per anticossos o bé rebuig actiu crònic mediat per anticossos. En el cas de rebuig crònic es pot observar en alguns casos fibrosi intersticial i atròfia tubular (FIAT) entre d'altres patologies.
3. Canvis mediats per limfòcits T: es caracteritza per infiltració de limfòcits a nivell intersticial. Agrupa casos de rebuig agut, amb diferents graus d'infiltració de cèl·lules T i tubulitis de moderada a greu així com casos de rebuig crònic mediat per cèl·lules T. En aquest últim cas, no es genera FIAT sinó fibrosi vascular a nivell arterial amb infiltració de cèl·lules mononuclears.
4. Canvis *Borderline*: sospites de rebuig agut mediat per cèl·lules T. Aquesta categoria s'utilitza quan no hi ha fibrosi a nivell vascular però sí diferents graus de tubulitis amb infiltració intersticial mínima o infiltració intersticial important amb tubulitis lleu.

5. Fibrosi intersticial i atròfia tubular (FIAT): Es caracteritza per no presentar anticossos circulants ni infiltració de limfòcits T i és, per tant, d'etiologia inespecífica. Es presenta en diferents graus de lesió (I, II i III) segons la quantitat de teixit fibrosat. El grau de lesió és I si afecta entre un 1 i 25%, II si afecta entre un 26 i un 50% i III si afecta més d'un 50% de l'àrea cortical.

6. Altres.

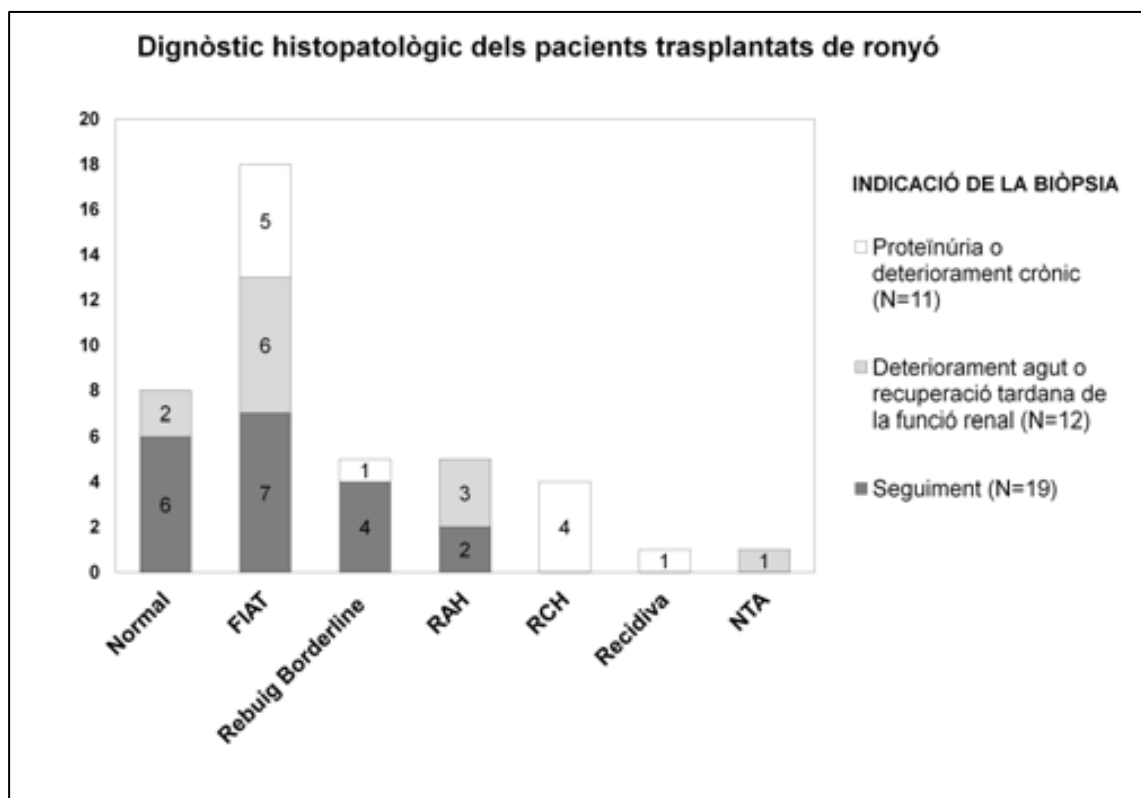


Figura 16. **Diagnòstic histopatològic dels pacients trasplantats de ronyó.** En el gràfic s'hi representen els diagnòstics histològics obtinguts seguint els criteris de Banff. S'hi desglossen els pacients segons indicació mèdica de la biòpsia: seguiment als 3 mesos, deteriorament agut o recuperació tardana de la funció renal o proteïnúria o deteriorament crònic de la funció renal. FIAT: Fibrosi intersticial i atròfia tubular, inclou FIAT grau I, II i III. RAH: Rebuig agut humoral. RCH: Rebuig crònic humoral. NTA: Necrosi tubular aguda.

En la Figura 16 es representen el nombre de pacients inclosos en cada categoria diagnòstica tenint en compte la indicació de la biòpsia. Donat el baix nombre de pacients i amb la finalitat de facilitar l'anàlisi estadística, les categories diagnòstiques "Rebuig borderline", "RAH, rebuig agut humoral" i "RCH, rebuig crònic humoral" es van agrupar dins una sola categoria: "Rebuig immunològic". També, es van agrupar les categories "Recidiva de la malaltia primària" i "NTA" en una sola categoria, "Altres" (Figura 17).

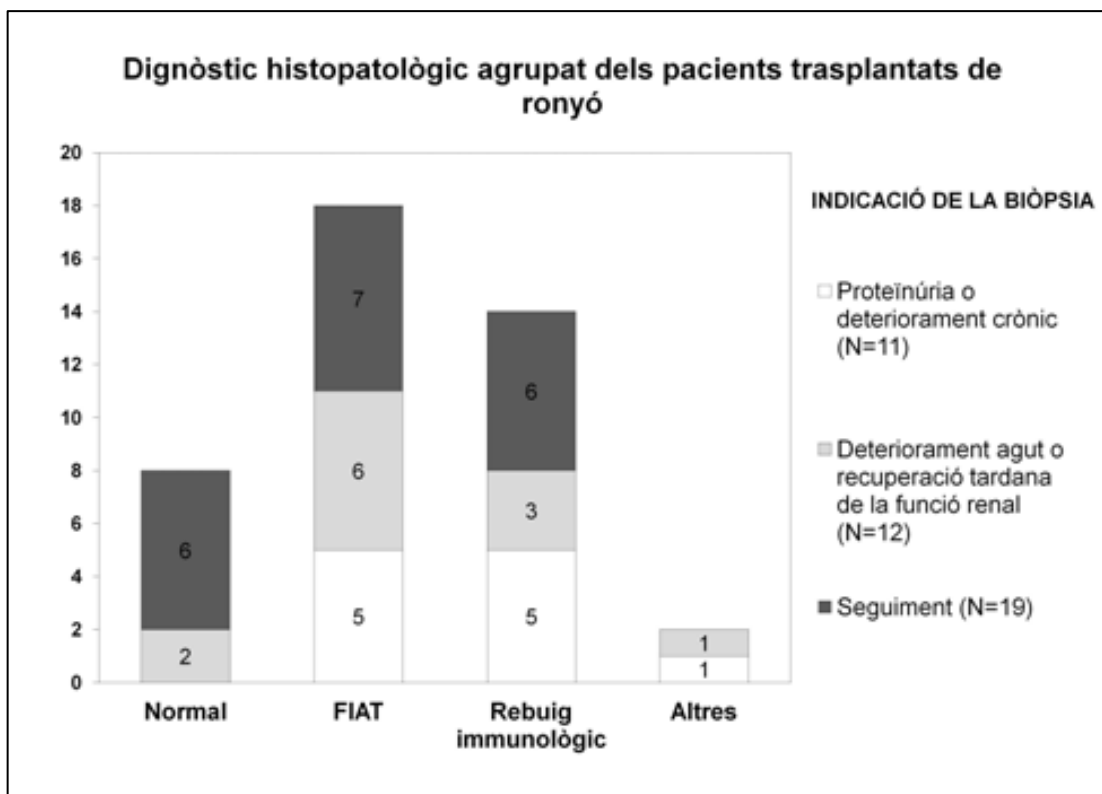


Figura 17. **Diagnòstic histopatològic agrupat dels pacients trasplantats de ronyó.** En el gràfic s'hi representen agrupats els diagnòstics histològics obtinguts. En el gràfic es mostren els pacients desglossats per la indicació mèdica de la biòpsia: seguiment als 3 mesos, deteriorament agut o recuperació tardana de la funció renal o proteïnúria o deteriorament crònic de la funció renal. FIAT: Fibrosi intersticial i atròfia tubular.

Paral·lelament, es van valorar una sèrie de paràmetres per valorar el dany renal per fàrmacs CNI: hialinòsi arteriolar i vacuolització isomètrica. Tant la hialinòsi arteriolar com la vacuolització isomètrica es poden trobar en diferents graus que es troben recollits a la Taula 11.

Taula 11. **Signes de nefrotoxicitat per fàrmacs CNIs, hialinosi arteriolar i vacuolització isomètrica, i graus en que es poden presentar.** La hialinosi arteriolar i la vacuolització isomètrica es poden donar en diferents graus (I, II i III) en funció de la quantitat de teixit afectat.

	Hialinòsi arteriolar	Vacuolització isomètrica
Grau 0	Absència de signes	Absència de signes
Grau I	Lleuger. De 1 a 25% de les arterioles afectades	Afectació de 1 a 25% de les seccions tubulars
Grau II	Moderat. De 26 a 50% de les arterioles afectades	Afectació de 26 a 50% de les seccions tubulars
Grau III	Sever. Més del 50% de les arterioles afectades	Afectació de >50% de les seccions tubulars

6.2. GRUP DE PACIENTS AMB INSUFICIÈNCIA RENAL CRÒNICA

Es va recollir orina i sang de pacients amb insuficiència renal crònica (IRC) d'estadi III o IV sobre ronyó natiu. Aquest grup es va incloure a l'estudi per tal de poder determinar si l'aparició dels biomarcadors avaluats seria deguda exclusivament a dany renal per fàrmacs CNIs i no per dany renal no relacionat amb transplantament renal. Els criteris d'inclusió i exclusió són els que es detallen a la taula 12.

Taula 12. **Criteris d'inclusió i exclusió a l'estudi del grup de pacients amb insuficiència renal crònica sobre ronyó natiu.**

PACIENTS AMB INSUFICIÈNCIA RENAL CRÒNICA	
Criteris d'inclusió	Criteris d'exclusió
<ul style="list-style-type: none"> - Pacients amb insuficiència renal crònica III/IV. - Filtrat glomerular 15-60 ml/min (MDRD) - Edats compreses entre 18 i 65 anys. 	<ul style="list-style-type: none"> - Pacients que hagin patit algun episodi cardiovascular (angor, infart agut de miocardi, accident vascular transitori, accident vascular cerebral, claudicació intermitent o insuficiència cardíaca congestiva).

Es van recollir mostres d'un total de 9 pacients amb insuficiència renal crònica, les dades descriptives es troben recollides a la Taula 13.

Taula 13. **Dades demogràfiques i paràmetres clínics dels pacients amb insuficiència renal crònica inclosos en l'estudi.** S'hi mostren el nombre de pacients desglosat per sexes, l'edat, els nivells de creatinina sèrica i la proteïnúria.

	Insuficiència Renal Crònica
N	9
N home/N dona	6/3
Edat (anys, mitjana \pm SEM)	52.9 \pm 4.01
Creatinina sèrica (mg/dl, mitjana \pm SEM)	1.96 \pm 0.198
Proteïnúria (g/dia, mitjana \pm SEM)	0.71 \pm 0.34

6.3. GRUP D'INDIVIDUS SANS

Es va obtenir sang i orina d'individus sans per comparar la presència o absència dels biomarcadors respecte a la resta de grups. Els criteris d'inclusió van ser els que es mostren a la Taula 14. Tretze mostres de controls sans van ser incloses a l'estudi (8 dones i 5 homes) d'edats entre 24 i 60 anys amb funció renal normal (0.76 \pm 0.04 mg/dl de creatina sèrica promig i proteïnúria negligible, < 0.05 mg/dia).

Taula 14. **Criteris d'inclusió i exclusió a l'estudi del grup d'individus sans.**

CONTROLS SANS	
Criteris d'inclusió	Criteris d'exclusió
<ul style="list-style-type: none"> - Majors de 18 anys. - Funció renal normal (valors normals de creatinina sèrica i proteïnúria). 	<ul style="list-style-type: none"> - Malalties autoimmunes o altres malalties que puguin alterar els nivells de factors en sang o orina. - Individus sotmesos a tractament amb fàrmacs CNIs o altres fàrmacs nefrotòxics per qualsevol altra causa.

6.4. GRUP DE PACIENTS TRASPLANTATS DE PULMÓ

Per tal de tenir un grup de pacients amb un únic factor causant de dany renal (fàrmacs anticalcineurínics) es van incloure a l'estudi pacients trasplantats de pulmó. Es van recol·lectar mostres de plasma i d'orina d'aquests pacients abans del transplantament i posteriorment al transplantament. Els criteris d'inclusió i exclusió es troben detallats a la Taula 15.

Taula 15. Criteris d'inclusió i exclusió a l'estudi del grup de pacients trasplantats de pulmó.

PACIENTS TRASPLANTATS DE PULMÓ	
Criteris d'inclusió	Criteris d'exclusió
<ul style="list-style-type: none"> - Pacients sotmesos a trasplantament de pulmó tractats amb CsA o FK506 com a immunosupressor. - Edat compresa entre 18 i 60 anys. - Funció renal normal (valors normals de creatinina sèrica, aclariment de la creatinina i proteïnúria) al moment del transplantament. 	<ul style="list-style-type: none"> - Pacients amb anticossos per als virus de l'hepatitis C i B. - Retrasplantament de qualsevol òrgan. - Pacients que hagin rebut tractament amb fàrmacs CNIs per qualsevol altra causa.

Es van recollir mostres seriades de 34 pacients trasplantats de pulmó, des de 1-2 dies a 1 any post-trasplantament, depenent del pacient. Aquests pacients es van codificar amb la nomenclatura "TP-n^o". D'aquests pacients es van utilitzar les mostres de 6 d'ells (TP-2, TP-5, TP-7, TP-17, TP-18 i TP-30) ja que es disposava de mostres d'orina i sang prèvies al trasplantament pulmonar i de suficients mostres seriades post-trasplantament per poder analitzar correctament les dades obtingudes. Les dades demogràfiques i mostres disponibles es troben detallades a la Taula 16.

Taula 16. **Sexe, edat al trasplantament pulmonar i mostres utilitzades per a la realització dels assaig ELISA.** * TP: *Trasplantament pulmonar.*

Pacient	Sexe	Edat al Trasplantament	Fàrmac immunosupressor de manteniment	Mostres d'orina i sang utilitzades en els assaig ELISA
TP-2	Home	45	Ciclosporina A	Pre-TP, 1 mes, 2.5 mesos i 4 mesos post-TP
TP-5	Dona	33	FK-506	Pre-TP, 1 setmana, 1 mes, 1.5 mesos i 2 mesos post-TP
TP-7	Home	53	Ciclosporina A	Pre-TP, 0.5 mesos, 2 mesos, 9 mesos, 10 mesos i 11 mesos post-TP
TP-17	Dona	60	FK-506	Pre-TP, 2 mesos, 3 mesos i 4 mesos post-TP
TP-18	Dona	59	Ciclosporina A	Pre-TP, 1 mes, 3 mesos, 5 mesos i 1 any post-TP
TP-30	Home	56	Ciclosporina A	Pre-TP, 0.5 mesos i 1 mes post-TP.

7. ANÀLISI ESTADÍSTICA

L'anàlisi de les dades es va realitzar utilitzant els *softwares* estadístics *Statgraphics* i *Graphpad prism 6*.

En els experiments realitzats en cultius cel·lulars, l'anàlisi estadística es va utilitzar un estadístic "t" si es comparaven únicament dues condicions experimentals. En el cas d'analitzar més de dues condicions experimentals, es va realitzar un test ANOVA univariant seguit de comparacions múltiples de rang de Bonferroni per conèixer les diferències entre les condicions d'estudi.

Les dades obtingudes amb pacients es van analitzar mitjançant tests estadístics no paramètrics ja que en la majoria de les situacions no es va obtenir normalitat de residus ni igualtat de variàncies entre els grups d'interès. Si es comparaven dos grups de pacients es va realitzar un test "t" amb correcció de Welch. Quan es van comparar les dades de 3 o més grups es va utilitzar l'estadístic de Kruskal-Wallis per conèixer si existia alguna diferència entre ells. En cas d'existir diferències entre els grups, es van realitzar comparacions múltiples de rang de Dunn. Les correlacions entre dos grups de dades es van realitzar per regressió lineal simple i les de tres grups de dades o més es van generar mitjançant models de regressió lineal múltiple.

Pel que fa a la interpretació dels tests estadístics, en tots els casos es va considerar que existia una relació estadísticament significativa entre els factors analitzats si el nivell de confiança era superior al 95 % (valor $P < 0.05$). Al tractar-se d'un estudi exploratori, si el valor P es trobava entre 0.05 i 0.1 es va assumir que existia una tendència o relació moderada entre els factors del model. Finalment, si el valor P era superior a 0.1 es va considerar que no hi havia relació entre els factors.

ANNEX MATERIALS I MÈTODES

1. COMPOSICIÓ DELS TAMPONS UTILITZATS

Els diferents tampons utilitzats en aquest treball es troben detallats en aquest apartat. Els principals subministradors de reactius i productes químics utilitzats són les cases comercials: Sigma Aldrich, Merck, Applichem, Panreac, GE Healthcare, Roche i Bio-Rad entre d'altres. Quan s'ha utilitzat un component específic d'una casa comercial s'indicarà la referència en la composició del tampó.

1.1. TAMPONS PER A CULTIUS CEL·LULARS I EXTRACCIÓ DE PROTEÏNES DE CULTIUS CEL·LULARS

Taula 17. Composició tampó PBS 1x.

PBS 1x		
Components	Concentració	Comentaris
NaCl	137 mM	Esterilitzar a l'autoclau.
KCl	2.5 mM	
Na ₂ PO ₄	10 mM	
KH ₂ PO ₄	1.4 mM	

Taula 18. Composició tampó de càrrega reductor Laemmlí 5x.

TAMPÓ DE CÀRREGA REDUCTOR LAEMMLI 5x		
Components	Concentració	Comentaris
Tris-HCl pH 6.8	62.5 mM	Cada cop que s'usa s'afegeix 2-mercapto-etanol fresc.
Glicerol	10 % (v/v)	
SDS	2 % (w/v)	
2-mercaptoetanol	5 % (v/v)	
Blau de Bromofenol	0.05 % (w/v)	

Taula 19. Composició del tampó de lisi de cèl·lules en cultiu.

TAMPÓ DE LISI			
Components	Concentració	Efecte	Comentaris
NaCl	150 mM	Manté la osmolaritat	Es conserva a 4 °C.
Tris-HCl pH 7.5	50 mM	Tamponador de pH	
EDTA	1 mM	Quelant d'ions bivalents	
Tritó X-100	2 % (v/v)	Tranca membranes cel·lulars	
NaF	25 mM	Inhibidors de fosfatases	S'afegeixen al moment d'ús.
Na ₃ VO ₄	1 mM		
Glicerol fosfat	10 mM	Tamponador de pH i inhibidor de fosfatases	S'afegeix al moment d'ús
Cocktail inhibidor de proteases (Sigma Aldrich, P8340)	1:200	Inhibidors de proteases	S'afegeixen al moment d'ús
Pefabloc (Roche, 11429876001)			

1.2. TAMPONS PER A WESTERN BLOT

Taula 20. Tampó d'electroforesi 5x i Tampó de transferència Towbin-SDS 1x.

TAMPÓ ELECTROFORESI 5x			TAMPÓ TOWBIN-SDS 1x		
Components	Concentració	Comentaris	Components	Concentració	Comentaris
Tris Base	125 mM	Diluir a la concentració de treball (1x) amb H ₂ O MilliQ™.	Tris Base	25 mM	Utilitzar a 4°C.
Glicina	0.96 M		Glicina	190 mM	
SDS	0.5 % (w/v)		SDS	0.1% (w/v)	
		Metanol	20% (v/v)		

Taula 21. Tampons per la realització dels gels de poliacrilamida.

TAMPONS PER GELS ACRILAMIDA			
Tampó	Component	Concentració	Comentaris
Tris-HCl 4x pH 6.8	Tris-HCl pH 6.8	0.5 M	Filtrar el Tris-HCl amb un filtre de 0.45 µm abans d'afegir l'SDS.
	SDS	0.4% (w/v)	
Tris-HCl 4x pH 8.8	Tris-HCl pH 8.8	1.5 M	
	SDS	0.4% (w/v)	

1.3. TAMPONS PER A ELECTROFORESI BIDIMENSIONAL

Taula 22. Tampons necessaris per l'electroforesi bidimensional.

TAMPONS PER ELECTROFORESI BIDIMENSIONAL				
Fase	Tampó	Component	Concentració	Comentaris
Isoelectroenfoc (IEF)	Solució de rehidratació	Urea	8 M	Conservar a -20 °C. Afegir IPG ampholine buffer i DTT al moment d'ús.
		CHAPS	2 % (w/v)	
		DTT	0.28 % (w/v)	
		IPG ampholine buffer pH 3-11 (GE Healthcare, 17-6004-40)	0.5 % (v/v)	
		Blau de bromofenol	0.02 % (w/v)	
SDS-PAGE	Solució d'equilibrat	Tris- HCl pH 8.8	50 mM	Conservar a -20 °C. Afegir al moment d'ús: + DTT al 1 % (w/v) (<u>Solució equilibrat reductora</u>) + Iodocetimida al 4 % (w/v) (<u>Solució d'equilibrat alquiladora</u>)
		Glicerol 87 %	30 % (v/v)	
		SDS	2 % (w/v)	
		Blau de bromofenol	0.02 % (w/v)	
	Gelificació 3x	Tris-HCl pH 8.45	3 M	Conservar a 4 °C.
	Anòdic 10x	Tris-HCl pH 8.9	1M	Conservar a 4 °C.
	Catòdic 10x	Tris base	1 M	Conservar a 4 °C.
		Tricina	1 M	

TAMPONS PER ELECTROFORESI BIDIMENSIONAL				
Fase	Tampó	Component	Concentració	Comentaris
		SDS	1 % (w/v)	
	Solució sellat	Agarosa	0.5 % (w/v)	Preparar en tampó catòdic 1x.
		Blau de bromofenol	0.02 % (w/v)	

Taula 23. Reactius necessaris per la tinció coomassie col-loïdal.

COOMASSIE COL-LOÏDAL			
Reactiu	Components	Concentració	Comentaris
Fixador	Etanol	50 % (v/v)	Conservar a temperatura ambient.
	Àcid ortofosfòric al 85 %	0.03 % (v/v)	
Coomassie col-loïdal "Silver Blue"	Àcid ortofosfòric al 85 %	10% (v/v)	Per preparar-ne un litre, en 100 ml d'H ₂ O MilliQ™ s'afegeix per ordre l'àcid ortofosfòric, el sulfat amònic i el coomassie G-250 escalfant la mescla a 50 °C. Un cop dissolt, enrasar a 800 ml amb H ₂ O MilliQ™ i afegir 200 ml de metanol a poc a poc i en agitació. Conservar a temperatura ambient fins a 6 mesos.
	Sulfat amònic	100 g/L	
	Coomassie Brilliant Blue G-250 (Bio-Rad)	1.2 g/L	
	Metanol	20 % (v/w)	

RESULTATS

1. DETERMINACIÓ DE LES CONDICIONS SUBTÒXIQUES DE LES DIFERENTS NOXAS

L'objectiu final de la present tesi és identificar nous biomarcadors en sang o orina que permetin diferenciar el dany de l'empelt renal causat per fàrmacs anticalcineurínics del dany causat per altres factors. A més, és de gran interès que aquests biomarcadors puguin detectar aquest tipus de dany de forma precoç per a poder adequar la dosi terapèutica dels immunosupressors a cada pacient, de manera que s'aconsegueixi una immunosupressió correcta tot evitant els efectes nefrotòxics.

Per tal de trobar marcadors específics d'aquest tipus de dany s'ha utilitzat com a model d'estudi la línia cel·lular humana derivada del túbul renal HK-2, ja que s'ha descrit que aquests fàrmacs produeixen toxicitat directa sobre la part tubular del ronyó. A més dels 2 fàrmacs CNI, també s'han tractat les cèl·lules HK-2 amb Rapamicina i Staurosporina. La identificació de les proteïnes secretades en resposta al fàrmac immunosupressor no CNI Rapamicina hauria de permetre discriminar quines proteïnes son secretades específicament en resposta a fàrmacs CNI i quines son secretades com a conseqüència d'un tractament immunosupressor no CNI. La Staurosporina és un potent inductor d'apoptosi que produeix alt grau de citotoxicitat en cèl·lules HK-2¹³⁴. Les proteïnes secretades per aquest últim compost podrien indicar canvis moleculars que portarien a toxicitat i mort cel·lular no relacionats amb l'acció de fàrmacs immunosupressors. La rapamicina i la staurosporina s'han assajat per tal d'incrementar la fiabilitat en quant a la especificitat de les possibles proteïnes identificades en l'anàlisi proteòmic. A tall d'exemple, una proteïna podria ser secretada per CNIs però també per rapamicina o staurosporina, per tant no seria una secreció específica.

Es van determinar les dosis subtòxiques de cada un dels fàrmacs tractant les cèl·lules HK-2 amb dosis creixents de cada un dels fàrmacs. Les dosis es van escollir tenint en compte resultats previs del grup^{89,95} i cercant bibliografia al respecte^{134,139-142}. Per determinar la citotoxicitat de cada un dels compostos, es van sembrar les cèl·lules en plaques de 24 pous a una densitat de $0,15 \times 10^6$ cels/ml. Trenta-sis hores després de la sembra, un cop assolida la confluència, es va aspirar

el medi complert en el que creixien les cèl·lules, es van rentar amb PBS 1x per eliminar les restes de FBS, i es va substituir per medi sense FBS contenint les diferents dosis de cada un dels compostos. Vint-i-quatre hores després de tractar les cèl·lules es va determinar la citotoxicitat mitjançant un assaig d'activitat LDH. Els valors s'han expressat en percentatge d'alliberament de l'enzim LDH sobre el contingut total de LDH de les cèl·lules. Les dades es van analitzar mitjançant el test estadístic ANOVA univariant. Per comprovar les diferències estadístiques entre dosis assajades i les cèl·lules no tractades s'ha utilitzat el contrast múltiple de rangs de Bonferroni. S'ha establert com a condició subtòxica la dosi anterior a la primera que significativament produeix citotoxicitat a 24 h de tractament.

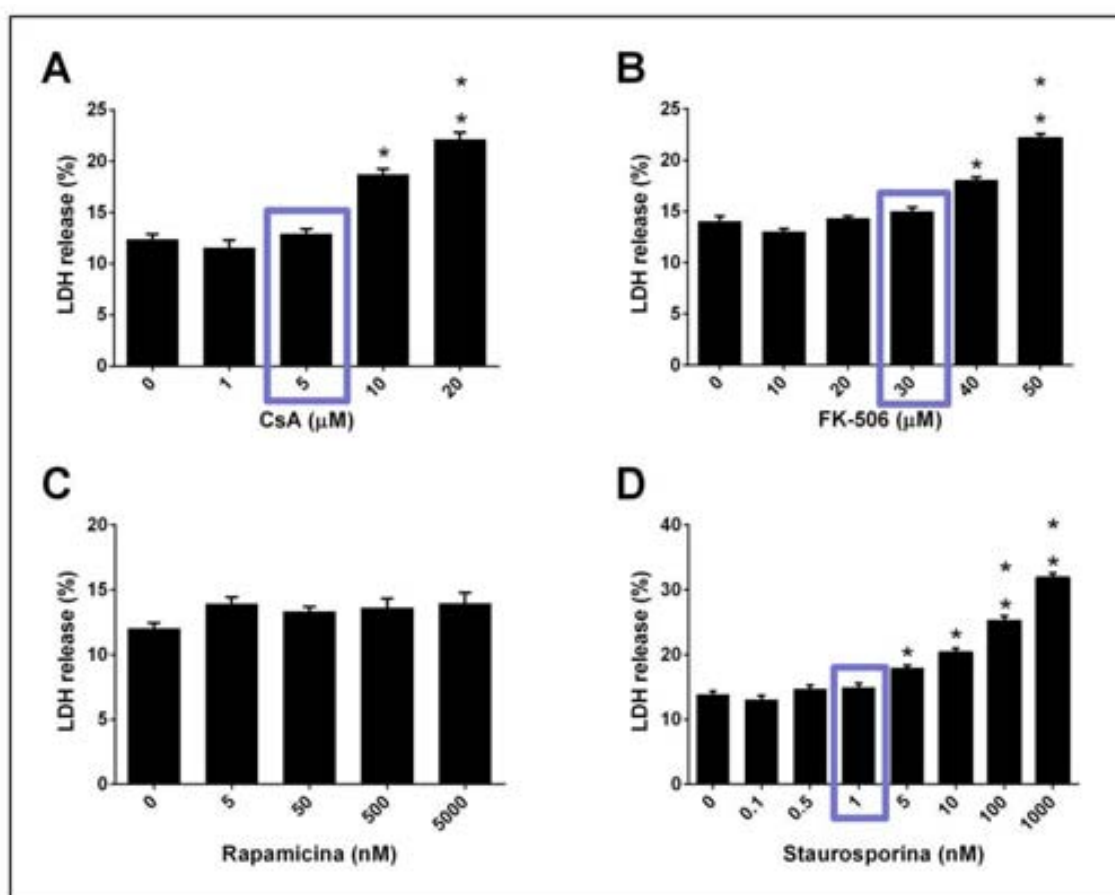


Figura 18. Toxicitat de la Ciclosporina A (CsA) (A), FK-506 (B), Rapamicina (C) i Staurosporina (D). Les cèl·lules HK-2 es varen tractar a dosis creixents de CsA, FK506, Rapamicina i Staurosporina durant 24h en medi sense FBS. Les cèl·lules control es van tractar amb el vehicle de dilució de cada un dels fàrmacs. La toxicitat es va determinar per assaig LDH. Els experiments es van realitzar per triplicat amb 3 replicques experimentals per condició. Els valors s'expressen mitjana i error estàndard de la mitjana (SEM). Els resultats es van analitzar mitjançant un test ANOVA univariant i es van determinar les diferències entre dosis assajades i les cèl·lules no tractades amb el contrast múltiple

de rangs de Bonferroni (*, valor $P < 0.05$ i **, valor $P < 0.01$). Encuadrat en blau es mostren les dosis subtòxiques en cada cas.

Com es pot observar a la Figura 18, la Rapamicina no va resultar tòxica a cap de les dosis assajades, raó per la qual es va excloure de l'estudi. Pel que fa a la resta dels fàrmacs testats, CsA, FK-506 i Staurosporina, les primeres dosis que significativament van produir toxicitat cel·lular van ser 10 μM , 40 μM i 5 nM, respectivament.

Atenent a aquests resultats, el posterior anàlisi proteòmic dels medis condicionats es va realitzar a les dosis subtòxiques de 5 μM , 30 μM i 1 nM per CsA, FK-506 i Staurosporina, respectivament (marcades en blau a la Figura 18).

2. ANÀLISI PROTEÒMIC DELS MEDIS CONDICIONATS

L'estudi proteòmic dels medis condicionats de cèl·lules HK-2 tractades a dosis subtòxiques dels diferents fàrmacs es va realitzar mitjançant electroforesi bidimensional. L'electroforesi bidimensional consta de dues fases, en la primera es separen les proteïnes per punt isoelèctric (PI) i en la segona en funció de la seva massa. Al final del procés s'obtenen mapes proteics on horitzontalment les proteïnes es troben separades per PI i en vertical segons la seva massa.

A la Figura 19 es mostren els mapes proteòmics dels medis condicionats o secretomes, obtinguts amb cada un dels tractaments. Com es pot observar, els mapes proteics dels diferents secretomes son essencialment molt similars al de les cèl·lules HK-2 sense tractar, fet que confirma que van ser obtinguts en unes condicions on no existia un alliberament indiscriminat de proteïnes intracel·lulars cap al medi resultant de processos de necrosi o apoptosi. Amb l'objectiu de detectar proteïnes que variessin la seva secreció per efecte de cada un dels tractaments, es va realitzar una comparació dels diferents secretomes respecte el mapa proteic del medi de les cèl·lules HK-2 no tractades utilitzant el *software* PD-Quest de Bio-Rad.

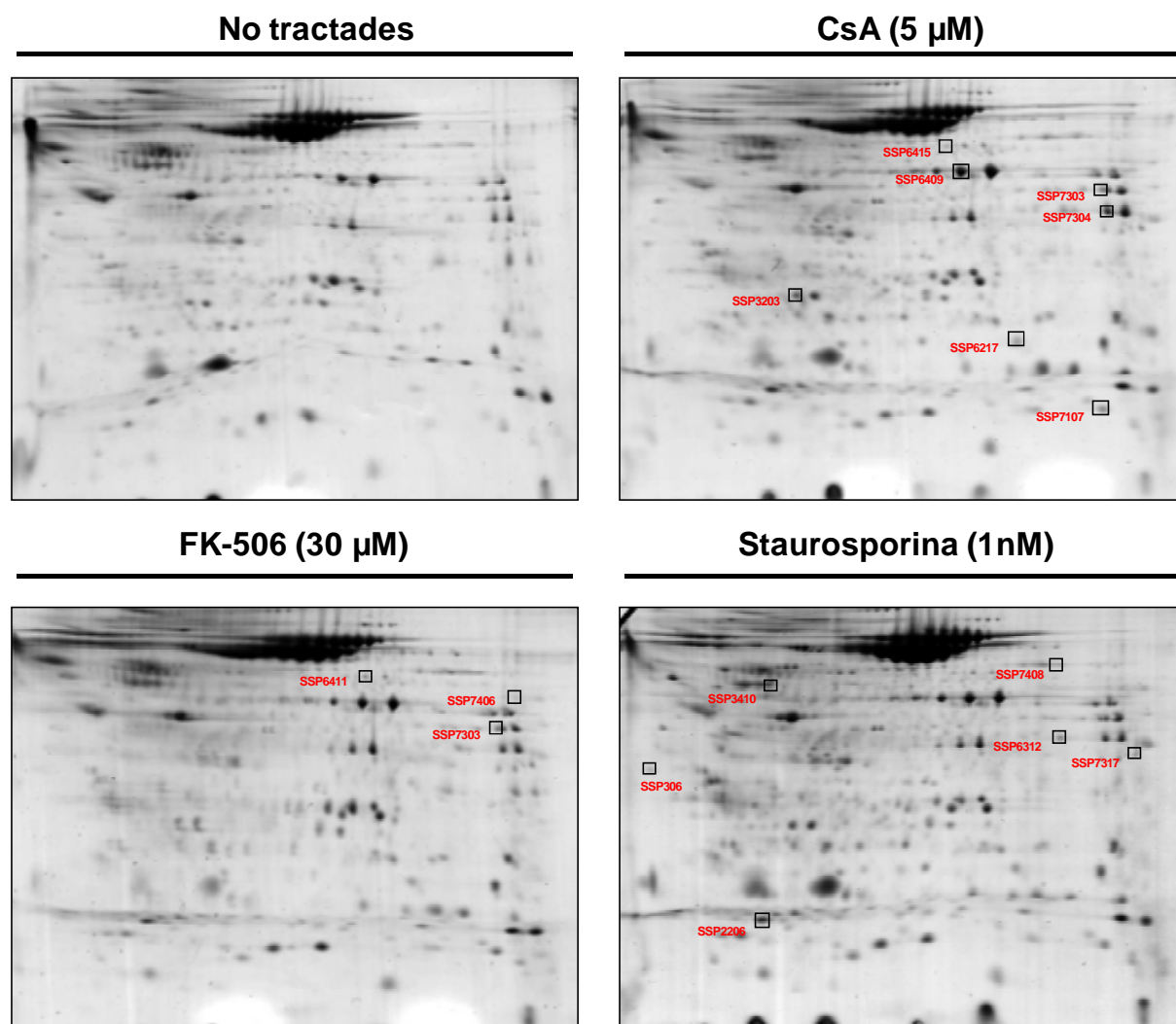


Figura 19. **Mapes proteòmics dels medis condicionats per CsA, FK-506 i staurosporina de les cèl·lules HK-2.** Les cèl·lules HK-2 es van tractar amb 5 µM CsA, 30 µM FK-506 i 1 nM Staurosporina durant 24 h en medi sense sèrum fetal boví. Els medis es van concentrar i es va quantificar el contingut proteic de cada mostra pel mètode BCA. Es van utilitzar 50 µg de proteïna per realitzar l'anàlisi proteòmic bidimensional. En vermell es remarquen les taques que incrementen la seva intensitat respecte al control.

El *software* PD-Quest de Bio-Rad permet l'anàlisi simultani de diferents mapes proteics corresponents a cada una de les condicions experimentals utilitzades. A partir dels mapes proteics que es volen analitzar el programa crea una imatge vectorial i gaussiana idealitzada de cada un que s'utilitza com a referència. A partir d'aquesta imatge model, el software determina la intensitat mitjana per àrea de cada una de les taques gaussianes. La intensitat de cada taca és extrapolada a partir de la següent fórmula matemàtica:

$$[Intensitat\ total\ spot = spot\ height \times \pi \times \sigma X \times \sigma Y].$$

Spot height és el pic de la representació gaussiana de la taca i correspon a la densitat òptica (DO) de la taca. σX i σY són les desviacions estàndard en la direcció del l'eix X i l'eix Y, respectivament. Ambdós valors es mesuren en unitats d'imatge (UI) que equival a 0.1mm. La UI conté un factor d'escalatge que s'utilitza per fer els nombres de la fórmula més manejables. Aplicant la fórmula, la unitat en que s'expressa la intensitat total de la taca és DO x àrea (mm²). Extrapolar la intensitat d'una taca a partir d'una imatge gaussiana resulta més precís que sumar les intensitats dels píxels inclosos en l'*spot*. Aquest càlcul es realitza per separat en cada una de les rèpliques dels mapes proteòmics a analitzar. Seguidament, el programa compara les intensitats totals promig de cada una de les taques de la condició d'estudi (secretomes de cèl·lules HK-2 tractades amb CsA, FK-506 o Staurosporina) amb la condició control (secretoma de cèl·lules HK-2 sense tractar) mitjançant un estadístic "t". D'aquesta manera podem conèixer quines taques incrementen o disminueixen significativament en intensitat en cada una de les condicions respecte a la condició control.

A la taula inferior (Taula 24) es troben detallats els valors d'intensitat total mig de cada taca i la condició en que es troba alterada la seva intensitat de manera estadísticament significativa. També s'ha calculat el grau de variació d'intensitat de cada taca respecte al control o *fold change*. Aquest paràmetre indica en quina mesura es modifica la intensitat de la taca enfront a la condició control i s'ha calculat com el quocient de la intensitat mitjana de la taca en el secretoma de les cèl·lules tractades i la intensitat mitjana de la mateixa taca en el secretoma de les cèl·lules sense tractar. Per tant, un *fold change* igual a 1 indica que no hi ha variació d'intensitat de la taca en comparació al control. En canvi, si el valor del *fold change* és inferior a 1 indica que la taca disminueix i si és superior a 1 que incrementa la seva intensitat envers a la condició basal.

Taula 24. Taques que varien significativament la seva intensitat en alguna de les condicions experimentals i proporció de la variació en cada condició respecte al secretoma de cèl·lules HK-2 no tractades. A la taula es troben detallades les taques que varien la seva intensitat en alguna condició experimental (# spot), els valors mitjos d'intensitat total i l'error estàndard (SEM) de cada una. Els valors mig d'intensitat total es donen en DO x Àrea (mm²). Es considera una variació d'intensitat estadísticament significativa (*) si el seu valor P és inferior a 0.05. Es destaca en negreta la condició o condicions en que varia significativament la intensitat de cada taca.

# spot	No tractades		CsA (5 µM)		FK-506 (30 µM)		Staurosporina (1 nM)		Fold change		
	Mitjana	SEM	Mitjana	SEM	Mitjana	SEM	Mitjana	SEM	CsA vs No tractades	FK-506 vs No tractades	Staurosporina vs No tractades
3203	922,6	29,1	1592,8 *	13,9	710,7	32,6	1447,0	49,1	1,7	0,8	1,6
6217	441,5	42,1	1412,5 *	7,8	532,3	42,3	1067,3	46,2	3,2	1,2	2,4
6409	15042,0	53,8	33362,5 *	17,3	15350,9	28,1	14483,0	51,3	2,2	1,0	1,0
6415	115,3	68,7	453,0 *	39,3	284,5	106,8	641,3	143,0	3,9	2,5	5,6
7107	287,5	57,7	964,1 *	23,8	782,5	57,3	522,6	58,2	3,4	2,7	1,8
7406	180,6	39,9	289,1	68,1	853,5 *	24,0	545,8	76,6	1,6	4,7	3,0
3307	1233,5	36,5	335,6 *	75,6	321,3 *	57,6	661,1	56,0	0,3	0,3	0,5
7303	301,4	27,7	678,5 *	24,6	690,9 *	22,5	959,0	58,1	2,3	2,3	3,2
6411	494,9	43,3	1324,1 *	115,1	1109,5 *	24,5	510,1	89,6	2,7	2,2	1,0
306	120,3	34,9	485,9	75,0	358,2	72,9	525,4 *	36,9	4,0	3,0	4,4
2206	1702,8	9,3	3133,7	16,5	1723,9	37,3	3139,5 *	19,4	1,8	1,0	1,8
3410	1067,7	78,8	610,4	112,7	862,7	84,7	3510,2 *	8,0	0,6	0,8	3,3
6312	370,4	50,7	809,9	44,7	1450,8	55,3	1329,0 *	36,8	2,2	3,9	3,6
7317	106,2	89,3	723,0	146,7	215,2	63,3	709,9 *	40,6	6,8	2,0	6,7
7408	964,0	104,9	1909,2	77,9	449,8	61,6	2683,0 *	15,4	2,0	0,5	2,8
6419	681,9	49,2	370,2	80,6	450,7	143,9	114,1 *	48,8	0,5	0,7	0,2
7218	88,6	55,1	2533,5	111,1	-- *	--	-- *	--	28,6	--	--

Després de realitzar una comparació minuciosa amb el programa PDquest, es va observar que cap dels tractaments aplicats va induir la secreció de cap proteïna que no es estigués ja present en el medi de cèl·lules sense tractar, és a dir, no vam ser capaços de detectar cap taca nova en cap de les condicions experimentals. Tot i això, si que es van observar diferències significatives en la intensitat de les diferents taques (Taula 24), suggerint que aquests tractaments modifiquen significativament la secreció d'algunes proteïnes. En la Taula 24 s'indiquen les 17 taques que varien significativament la seva intensitat en alguna de les condicions experimentals.

Les dades detallades a la Taula 24 també mostren els valors de *fold change* respecte les cèl·lules control. Cal recordar que els *fold change* es una mesura orientativa i està calculat utilitzant les intensitats mitjanes de cada taca, així es poden donar casos en que tot i presentar un *fold change* elevat, les diferències entre les condicions no siguin significatives per presentar un error estàndard (SEM) elevat. Aquest fet, s'ha tingut en compte en la posterior selecció de proteïnes com a possible biomarcador.

Tot i que es van detectar 17 taques diferencials tant sols es van seleccionar per a identificar les taques intensitat de les quals incrementava respecte a la condició de referència (senyalades vermell a la Figura 19). En principi les taques que incrementen la seva intensitat respecte al control representen proteïnes que podrien ser detectables en sang i/o orina i, per tant, ser útils com a biomarcador. En total 14 taques es van retallar i portar a identificar per espectrometria de masses: 5 per CsA (*spots* # 3203, 6217, 6409, 6415 i 7107), 1 per FK-506 (*spot* # 7406), 2 per ambdós fàrmacs CNIs (*spots* # 7303 i 6411) i 6 per Staurosporina (*spots* # 306, 2206, 3410, 6312, 7317 i 7408).

3. IDENTIFICACIÓ DE LES PROTEÏNES DIFERENCIALMENT SECRETADES I SELECCIÓ DE LES PROTEÏNES A TESTAR EN PACIENTS

Les taques seleccionades en l'apartat anterior es van retallar del gel per ser identificades per espectrometria de masses MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Desorption and Ionization-Time Of Flight mass spectrometry*). S'afegeix tripsina a les taques retallades per hidrolitzar la proteïna que conté i generar una combinació de pèptids característica de cada proteïna. Els pèptids es barregen amb una matriu orgànica sòlida que en ser excitada amb un laser fa que els pèptids continguts en la mostra a l'hora s'ionitzin i passin a fase gas. L'espectròmetre de masses determina la relació massa càrrega dels pèptids ionitzats (m/z) i calcula les masses dels pèptids originals. Aquestes masses es comparen amb les generades a partir de bases de dades de proteïnes, el que permet conèixer de quina proteïna es deriven els pèptids de la mostra.

De les 16 taques seleccionades, 9 es van poder identificar per espectrometria de masses, en general, per MALDI-TOF (Taula 25). Per aquelles taques que no es van poder identificar emprant aquesta tècnica, es va utilitzar espectrometria de masses en tàndem (ESI-MS/MS), en tal cas s'indica a la Taula 25. L'anàlisi per espectrometria de masses en tàndem ESI (*Electro Spray Ionization*)-MS/MS es una tècnica mes complexa i sofisticada que MALDI-TOF. Amb aquesta tècnica la ionització i desorció es produeix injectant la mostra carregada en forma d'esprai i eliminant el solvent, el que produeix els ions peptídics en fase gas. Posteriorment es mesura la massa dels pèptids i es fragmenten per tal d'obtenir informació sobre la seqüència d'aminoàcids de cada pèptid. En ambdós casos, el coneixement de part de la seqüència aminoacídica permet identificar la proteïna amb un grau de certesa molt elevat.

Taula 25. **Proteïnes identificades per espectrometria de masses.** Número de *spot*, identificació, fàrmac inductor de la seva secreció i paràmetres d'identificació. El *Score* expressa la probabilitat de que la identificació sigui correcta, qualsevol *score* per sobre d'un llindar es dona com estadísticament significativa. El llindar utilitzat depèn de la base de dades emprada, tots els *scores* de les proteïnes identificades superaren el llindar establert, 56. *Peptide matched* indica el número de pèptids identificats. % *seq* és el percentatge de seqüència coberta amb els pèptids identificats. % *Intensitat*: percentatge de les intensitats dels pèptids assignats a la proteïna, permet saber si els pics més intensos s'assignen a la proteïna.

Spot	Identificació (Acces #)	Fàrmac inductor	pI	Mw (kDa)	Score	Peptide matched	% Seq	% Intensitat	Observacions
6411	Fascin-1 (FSCN1_HUMAN)	FK-506 i CsA	6.84	55.12	74	7	19	49	
7408	Pyruvate kinase isozymes M1/M2 (KPXM_HUMAN)	Staurosporina	7.96	58.47	122	11	29	23	Confirmada per MS/MS
6409	Alpha-enolase (ENO3_HUMAN)	CsA	7.01	47.481	164	22	58	51	
6409	Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI1_HUMAN)	CsA	6.68	45.08				17	Identificada per MS/MS
7303	Fructosa-bisphosphate aldolase A (ALDOA_HUMAN)	CsA i FK506	8.3	39.85	151	15	53	52	
7304	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G3P_HUMAN)	CsA	8.57	36.20					Identificada per MS/MS
2206	Galectin-1 (LEG1_HUMAN)	Staurosporina	5.34	15.05					Identificada per MS/MS
3203	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1 (UCHL1_HUMAN)	CsA	5.33	25.15	97	10	45	35	Confirmada per MS/MS
3410	Fructose-bisphosphate aldolase A (ALDOA_HUMAN)	Staurosporina	8.3	39.85	74	8	41	33	Confirmada per MS/MS

Un cop identificades les proteïnes diferencialment secretades, es van aplicar una sèrie de criteris arbitraris per tal d'acotar i seleccionar aquelles proteïnes que posteriorment serien testades com a possibles biomarcadors analitzant la seva presència en sang i orina de pacients trasplantats.

En primer lloc, es van triar proteïnes que específicament i significativament incrementessin la seva presència en medi de cèl·lules HK-2 per efecte de CsA i/o FK-506, i no per Staurosporina per tal de descartar aquelles proteïnes que serien secretades inespecíficament en resposta a qualsevol estrès cel·lular (Figura 19 i Taules 24 i 25). Per tal d'obtenir la màxima especificitat possible, també es va tenir en compte que el *fold change* de la intensitat mitja de la taca que representa la proteïna sigui superior a 1 en els tractaments amb CsA i/o FK-506, i igual o inferior a 1 amb Staurosporina, respecte a les cèl·lules no tractades (Taula 24). Preferentment, s'han triat proteïnes no relacionades amb metabolisme mitocondrial oxidatiu ja que molts processos d'estrès cel·lular alteren aquestes vies^{143,144}, raó per la que podrien no indicar efectes específics dels CNIs. Finalment, es va realitzar una cerca bibliogràfica acurada de cada una d'elles per determinar si podrien tenir algun paper en el desenvolupament de la toxicitat per fàrmacs anticalcineurínics i el dany renal. Seguint aquests criteris, es van escollir 2 proteïnes per testar la seva aparició en pacients trasplantats de ronyó o de pulmó: el **Plasminogen-activator inhibitor-1 (PAI-1)** i la **Fascina-1**.

La proteïna **PAI-1**, que correspon al *spot* #6409, va ser identificada com a proteïna diferencialment secretada en resposta al tractament amb CsA. La seva presència es duplica en el medi de cèl·lules tractades amb CsA (*fold change* CsA vs no tractades=2.2) sense variar en la resta de condicions assajades (Taula 24). Es tracta d'una proteïna plasmàtica implicada en la inhibició del procés de fibrinòlisis¹⁴⁵. S'ha observat en diversos estudis que aquesta proteïna podria tenir un paper en el desenvolupament de la fibrosis intersticial en diverses patologies renals^{146,147}, i també en la disfunció de l'empelt renal^{148,149}.

La Fascina-1, corresponent a l'*spot* #6411, es troba en més abundància en els medis condicionats de cèl·lules HK-2 tractades tant amb CsA com amb FK506 (*fold change* respecte no tractades de 2.7 i 2.2 respectivament), però no així en el

tractament amb Staurosporina (Taula 24). La Fascina-1 és una proteïna del citoesquelet de 55kDa, que permet la disposició en bandes de les fibres d'actina, forma part de la família de les *actin-cross linking proteins*¹⁵⁰. S'expressa fonamentalment en el sistema nerviós i en teixits mesenquimals. Participa de la estructura i dinàmica normal del citoesquelet d'actina i en la formació de protrusions corticals que permeten interacció entre cèl·lules i migració cel·lular. La sobreexpressió de Fascina-1 s'ha relacionat amb agressivitat tumoral¹⁵¹ i sembla que té un rol important en el procés de transició epiteli-mesenquima (EMT) en diversos carcinomes^{152,153}. El fet que estigui implicat en mobilitat i invasió cel·lular i que s'expressi en teixits amb característiques mesenquimals suggereix que aquesta proteïna podria tenir un paper en el procés de transició epiteli mesenquima de les cèl·lules tubulars induïda per fàrmacs CNIs. A més, recentment s'ha descrit que la Fascina-1 és diana dels anàlegs de la migrastatina, potents inhibidors de la metàstasi tumoral¹⁵⁴. Que la Fascina-1 pugui interaccionar amb fàrmacs reforça la idea que la CsA i FK-506 podrien interferir en les funcions de normals d'aquesta proteïna.

4. VALIDACIÓ DE LA SECRECIÓ FASCINA-1 PER TÈCNIQUES ALTERNATIVES

Per tal de validar els resultats obtinguts mitjançant tècniques proteòmiques, es va analitzar la presència de Fascina-1 i PAI-1 en el medi condicionat de cèl·lules HK-2 tractades amb CNIs utilitzant immunodetecció per WB. Es van tractar les cèl·lules en medi sense FBS amb CsA 2.5 μ M i 5 μ M, FK-506 15 μ M i 30 μ M i Staurosporina 1 nM durant 24 h. Per cada condició es va recollir el medi de cultiu i es van realitzar extractes cel·lulars. La Fascina-1 es va detectar per Western Blot, tant en medis de cultiu com en extractes cel·lulars. Pel que fa a PAI-1, no es va poder comprovar per *western blot* la seva presència en medi de cèl·lules HK-2 tractades amb CNIs donat que es van testar diversos anticossos i cap va donar senyal. Finalment, també es va detectar ciclofilina B (CypB), una proteïna secretada específicament per CsA^{155,156}, com a control positiu d'acció de la CsA. En aquest sentit, cal remarcar que CypB no s'ha detectat en l'anàlisi proteòmic ja que pel seu punt isoelèctric apareix en una zona del mapa proteòmic que no es resol correctament.

Per quantificar la proteïna present en cada condició es va calcular la intensitat de les bandes obtingudes utilitzant el software *Quantity One* de BioRad (Figura 20, B i C). El programa calcula la intensitat de les bandes sumant la intensitat dels píxels inclosos dins la banda i corregint pel valor de la intensitat de fons o *background*. Els nivells de les proteïnes mesurades als extractes cel·lulars s'han referit als nivells de MAPKt per tal de contrarestar possibles errors en la càrrega de les mostres. Per les proteïnes detectades en medi de cultiu, es va assumir que en totes les condicions s'havia sembrat el mateix nombre de cèl·lules.

Com es pot observar al panell A de la Figura 20, la ciclofilina B es secreta tant sols en cèl·lules HK-2 tractades amb CsA, fet que demostra l'especificitat i per tant la fiabilitat dels nostres resultats. La major presència en el medi de Fascina-1 en el medi de cèl·lules HK-2 tractades amb CsA o FK-506 es va confirmar per *western blot* en 4 experiments independents. La sortida de Fascina-1 induïda per fàrmacs CNIs es va evidenciar de forma significativa (Figura 20, C). Fascina-1 és secreta en major grau a 5 μ M de CsA i a 30 μ M de FK-506 que a la dosi anterior en ambdòs casos (Figura 20, A i C) pel que l'alliberació d'aquesta proteïna al medi podria ser dosi

depenent. En l'extracte cel·lular sembla que les cèl·lules HK-2 tractades amb 5 μ M de CsA i 30 μ M de FK-506 tinguin nivells inferiors de Fascina-1 que en la resta de condicions, tot i que no de forma significativa (Figura 20, B).

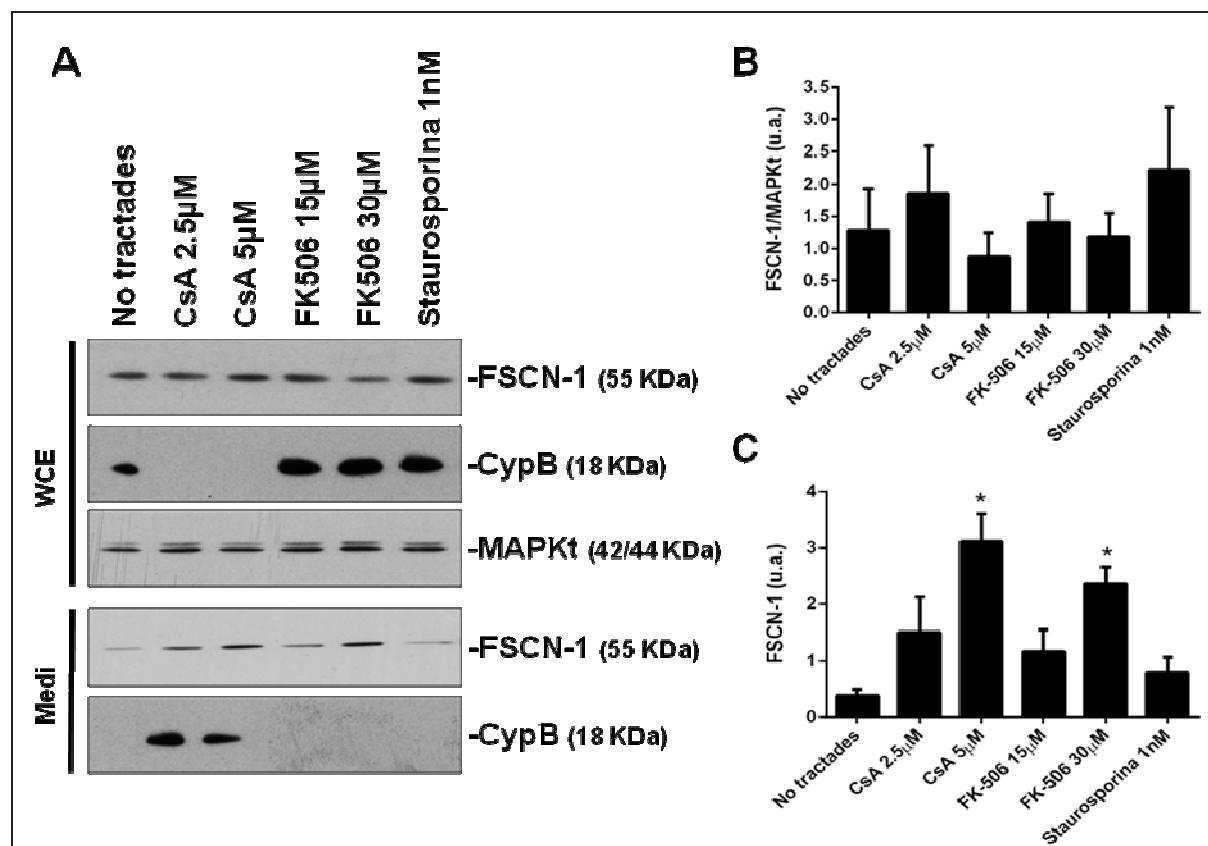


Figura 20. La Fascina-1 és més abundant en medis de cultiu de cèl·lules HK-2 tractades amb CsA i FK-506. Es van tractar les cèl·lules HK-2 durant 24 h en medi sense FBS amb CsA 2.5 μ M i 5 μ M, FK-506 15 μ M i 30 μ M, staurosporina 1nM. El control va ser tractat amb el vehicle de dilució dels fàrmacs (etanol absolut). Es va detectar per western blot Fascina-1, Ciclofilina B i MAPKt (control de càrrega) utilitzant 5 μ g d'extracte cel·lular (WCE) i 35 μ L de medi de cultiu d'HK-2 en cada condició (A). En els gràfics s'hi representa el la mitjana de 4 experiments amb dos rèpliques per experiment de Fascina-1 en extracte cel·lular (B) i medi (C). En el gràfic C podem observar que hi ha significativament nivells majors de Fascina-1 en els medis de les cèl·lules tractades amb CsA 5 μ M i FK-506 30 μ M que al de les cèl·lules sense tractar. Les dades s'han analitzat per ANOVA univariant i les comparacions múltiples s'han calculat pel mètode de Bonferroni comparant els valors de les cèl·lules tractades amb els diferents fàrmacs amb els valors de les cèl·lules no tractades (* $p < 0.05$).

5. VALIDACIÓ DE PAI-1 I FASCINA-1 COM A BIOMARCADORS DE TOXICITAT PER CNIS

Per tal de comprovar si les proteïnes seleccionades, PAI-1 i Fascina-1, podrien ser útils com a biomarcadors de dany renal per CNIs es van valorar els seus nivells en sang i orina utilitzant assaigs ELISA comercials en diferents grups de pacients: pacients trasplantats renals amb règim immunosupressor basat en CNIs, pacients amb insuficiència renal crònica (IRC) sense tractament amb CNIs i individus sans control (detallats en l'apartat 6 del Material i Mètodes). Es va incloure el grup de pacients amb IRC per tal de poder descartar que l'aparició de PAI-1 i Fascina-1 en sang o orina fos deguda al dany renal *per se*, i no una conseqüència específica de la nefrotoxicitat per CNIs.

Un cop analitzada la presència de PAI-1 i Fascina-1 en les diferents mostres es va correlacionar amb marcadors de funció renal coneguts amb l'objectiu de determinar si aporten o no informació nova com a biomarcador de dany renal. Els marcadors utilitzats van ser: nivells de creatinina sèrica, proteïnúria i nivells de KIM-1 i NGAL en orina. Paral·lelament, es va relacionar l'aparició en sang o orina de les proteïnes d'interès amb el diagnòstic histopatològic segons els criteris de Banff dels pacients trasplantats de ronyó per a determinar si l'aparició d'aquestes podria estar relacionada amb signes de dany renal histològics.

Finalment, es va determinar si l'aparició de PAI-1 i Fascina-1 en les diferents mostres correlacionava amb la toxicitat renal per CNIs. A tal efecte, es van analitzar els nivells de PAI-1 i Fascina-1 en sang i orina en funció dels signes histològics de nefrotoxicitat per CNIs: vacuolització isomètrica de les cèl·lules tubulars i hialinosi arteriolar. Per últim, es va realitzar una correlació dels nivells sèrics i urinaris tant de PAI-1 com de Fascina-1 amb els nivells sistèmics de fàrmac CNI.

En tots els casos, donat que hi ha pocs individus en tots els grups i no hi ha el mateix nombre d'individus en cada un d'ells, no s'obté igualtat de variàncies (contrast de Bartlett, $p < 0.05$) i en la majoria dels casos tampoc s'obté normalitat de residus (test de Shapiro-Wilks, $p < 0.05$). Per aquesta raó, l'anàlisi estadística sempre s'ha realitzat assumint dades no paramètriques. Mitjançant el contrast de

Kruskal-Wallis es possible comparar les medianes entre grups. En cas d'haver alguna diferència entre les medianes, s'ha utilitzat el contrast múltiple de rangs per a dades no paramètriques de Dunn per conèixer entre quins grups es dona la diferència.

5.1. DETECCIÓ DE PAI-1 EN SANG I ORINA DE PACIENTS TRANSPLANTATS DE RONYÓ

Tal i com s'ha indicat anteriorment, es van mesurar els nivells de PAI-1 per assaig ELISA en plasma i orina de pacients trasplantats de ronyó, pacients amb disfunció renal crònica i voluntaris sans. Totes les mostres es van assajar per duplicat i es van obtenir en tots els casos coeficients de variació intra i entre-assaig inferiors al 10 %. L'assaig ELISA utilitzat (*Human-PAI-1* Invitrogen ref. KHC3071) té un rang dinàmic de 0.0625 ng/ml a 4 ng/ml. Segons la casa comercial, els valors esperats per mostres de plasma d'individus sans s'haurien de trobar entre 0.320 i 8.560 ng/ml.

Com es pot observar a la Figura 21 (A) els nivells de PAI-1 en plasma obtinguts en els tres grups de pacients entraven dins el rang de la normalitat (individus sans) assignat per la casa comercial de l'ELISA. No es van observar diferències en quant als nivells en sang de PAI-1 entre el grup de controls sans i el grup de pacients amb insuficiència renal crònica, mentre que els pacients trasplantats mostraven valors significativament més elevats que la resta de grups (Figura 21, B).

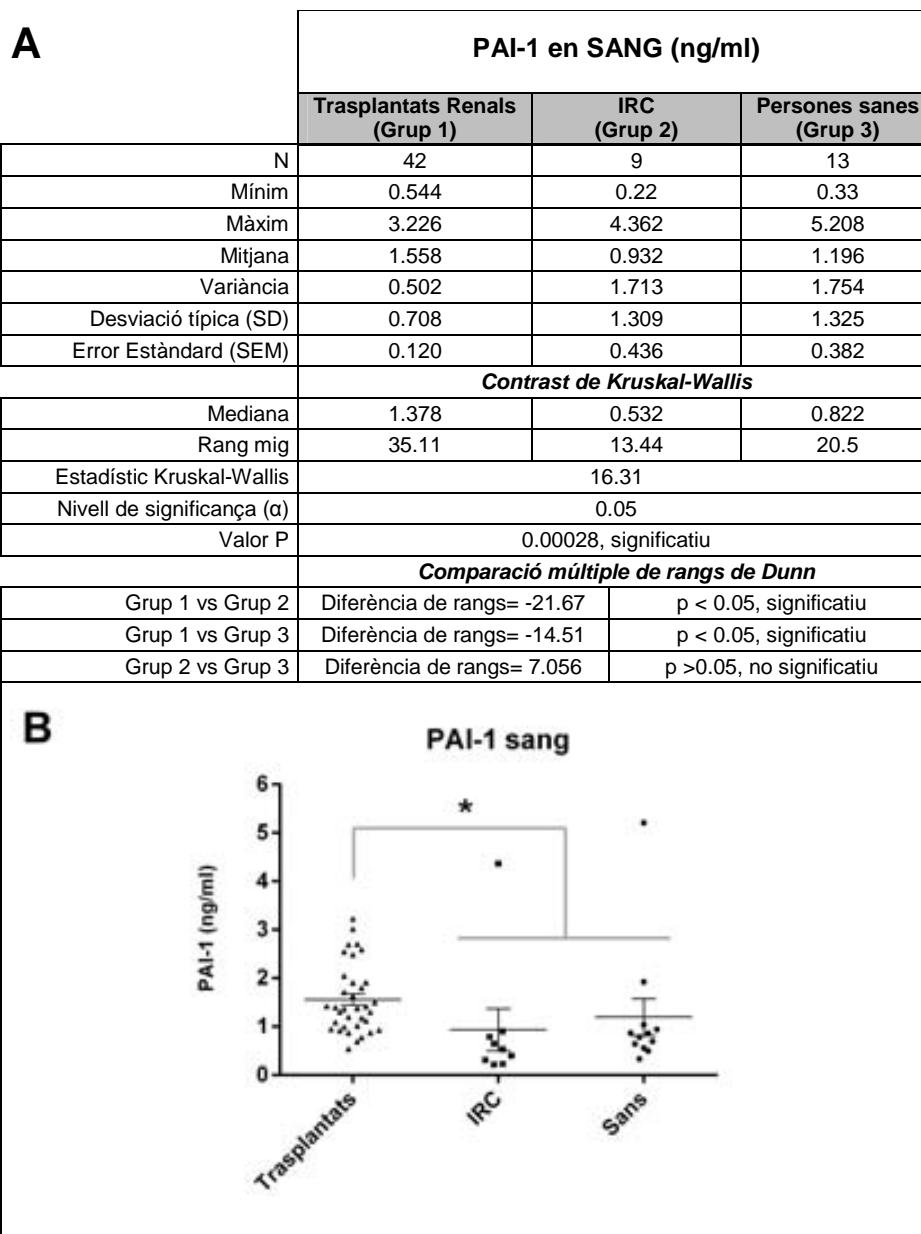


Figura 21. Nivells de PAI-1 en sang del grup de pacients trasplantats de ronyó, dels pacients amb insuficiència renal crònica (IRC) i dels individus sans. Els pacients trasplantats de ronyó mostren nivells de PAI-1 en sang significativament més elevats que la resta de grups. En la taula superior (A), es mostra la estadística descriptiva (valor mínim i màxim, la mitjana, la mediana, la variància, la desviació típica i l'error estàndard de cada grup) i inferencial (contrast de Kruskal-Wallis i les comparacions múltiples de Dunn) dels nivells de PAI-1 en sang dels 3 grups. Les dades de la taula es troben representades al gràfic B. Els valors s'expressen com a mitjana \pm SEM (*, $p < 0.05$).

Respecte als nivells de PAI-1 que es van obtenir en orina, moltes mostres es van trobar per sota del rang de detecció de l'assaig (Taula 26). Tant sols, en algunes mostres dels pacients amb dany renal crònic i pacients trasplantats de ronyó es van obtenir alguns valors apreciables (màxims expressats en Taula 26) encara que baixos. En el grup de persones sanes tots els valors que es van obtenir van ser

inferiors al límit de detecció de l'assaig (0.0625 ng/ml). En pacients amb insuficiència renal crònica i els trasplantats de ronyó aproximadament la meitat no presentaven nivells apreciables de PAI-1 urinari (PAI-1 < 0.0625 ng/ml).

Taula 26. **Estadística descriptiva dels nivells de PAI-1 (ng/ml) en orina dels 3 grups: pacients trasplantats de ronyó, pacients amb dany renal crònic i voluntaris sans.** A la part superior de la taula s'hi reflecteixen el valor mínim i màxim, la mitjana, la variància, la desviació típica i l'error estàndard de cada grup. Per poder donar un valor de mitjana i variància, els valors inferiors al límit de detecció de l'assaig (PAI-1 < 0.0625 ng/ml) s'han expressat com a 0.

PAI-1 en ORINA (ng/ml)			
	Trasplantats Renals (Grup 1)	IRC (Grup 2)	Persones sanes (Grup 3)
N	42	9	13
Mínim	< 0.0625	< 0.0625	< 0.0625
Màxim	0.56	0.048	< 0.0625
Mitjana	0.045	0.014	0.0008
Variància	0.013	0.00035	0.000007
Desviació típica (SD)	0.116	0.018	0.003
Error Estàndard (SEM)	0.018	0.0062	0.00086

El contingut proteic de la orina és molt variable entre individus. Per tal de resoldre aquesta variació entre pacients s'han corregit o estandarditzat els valors obtinguts per assaig ELISA en funció d'un estàndard intern, fent així les mesures comparables. A tal efecte, s'han referit els valors de PAI-1 en orina (i també de Fascina-1) a la concentració de creatinina urinària. Molts biomarcadors urinaris es normalitzen segons els nivells de creatinina urinària ja que s'assumeix que se s'excreta a la orina de forma pràcticament regular al llarg del temps¹⁵⁷.

A la Figura 22 (A) es troben recollits els nivells de PAI-1 en orina un cop estandarditzades les dades. No es van observar diferències significatives entre els grups, encara que els pacients trasplantats de ronyó presentaven de mitjana major concentració de PAI-1 en orina (Figura 22, B).

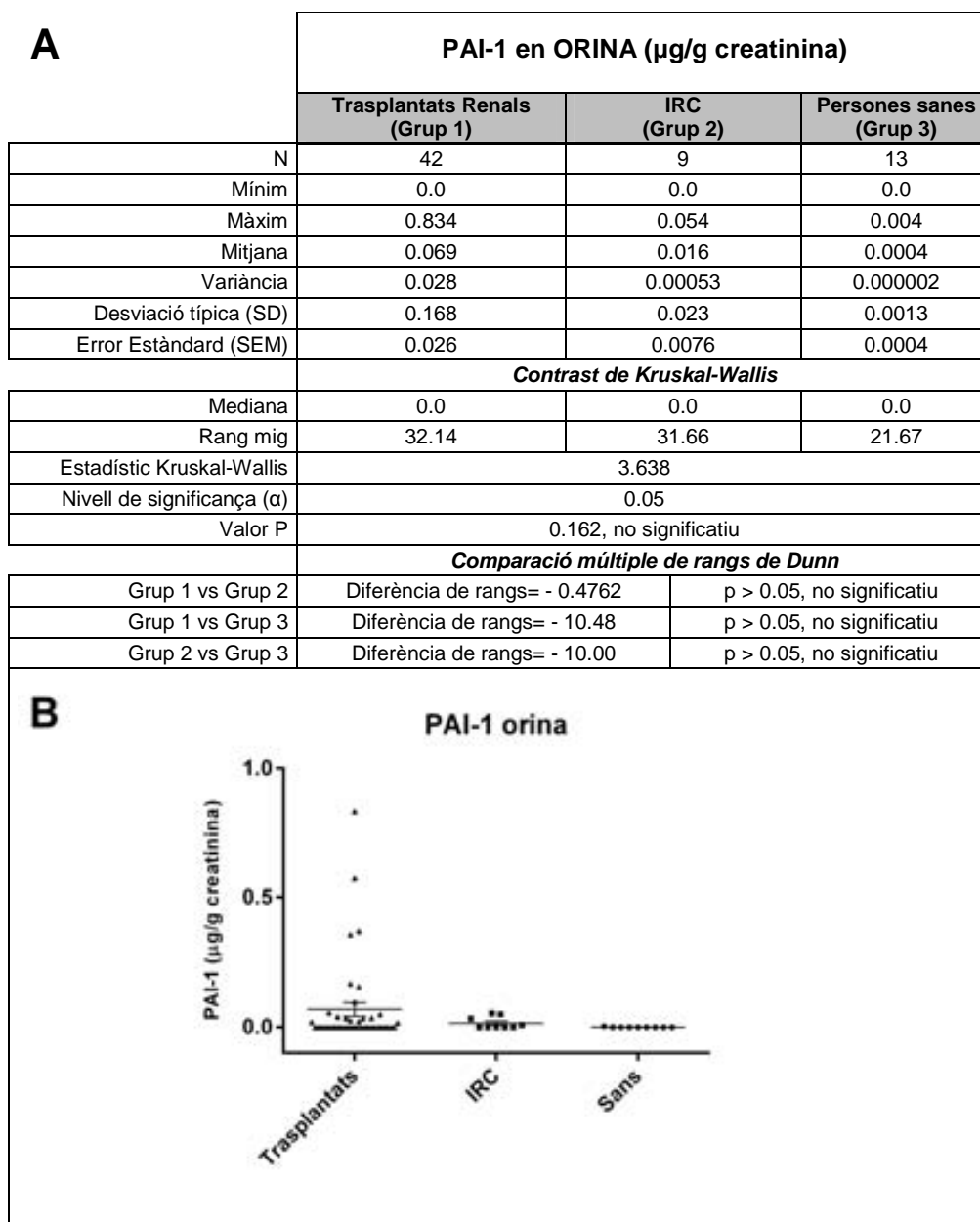


Figura 22. Nivells de PAI-1 en orina ($\mu\text{g/g}$ creatinina) del grup de pacients trasplantats de ronyó, dels pacients amb insuficiència renal crònica (IRC) i dels individus sans. No hi ha diferències significatives pel que fa als nivells de PAI-1 en orina entre els grups. En la taula superior (A), es mostra la estadística descriptiva (valor mínim i màxim, la mitjana, la mediana, la variància, la desviació típica i l'error estàndard de cada grup) i inferencial (contrast de Kruskal-Wallis i les comparacions múltiples de Dunn) dels nivells de PAI-1 en orina dels 3 grups. Les dades de la taula es troben representades al gràfic B on els valors s'expressen com a mitjana \pm SEM.

5.1.1. Comparació dels nivells de PAI-1 urinaris amb els de PAI-1 sanguinis

Comparant la concentració en sang i en orina d'un cert tipus de proteïna sanguínia es pot obtenir informació sobre el seu origen. Si els nivells són més elevats en sang que en orina l'aparició en orina d'aquesta proteïna probablement es doni per pèrdua de proteïnes sèriques per disfunció del glomèrul o del túbul, tot i que no es pot descartar que provingui directament del ronyó. Si pel contrari, els nivells de la proteïna en orina són similars o superiors als nivells sanguinis podríem dir que la proteïna apareix a la orina per una raó independent als problemes de filtrat glomerular o de reabsorció indicant que la seva presència en orina podria ser explicada per secreció tubular. Aquesta assumpció es basa en que, tot i que el pacient pateixi disfunció glomerular o tubular ocasionant proteïnúria, difícilment les proteïnes plasmàtiques es trobaran a una concentració superior en orina que en sang.

A la Figura 23 es comparen els nivells de PAI-1 en plasma amb els d'orina en els diferents grups. Per realitzar aquest anàlisi es van utilitzar les dades en orina sense normalitzar pels nivells de creatinina. En tots els grups la concentració de PAI-1 era significativament major en sang que en orina. Per això, el lleuger increment de concentració de PAI-1 en orina en els pacients trasplantats de ronyó podria ser explicat per pèrdua de proteïnes sèriques a la orina per efecte de la proteïnúria.

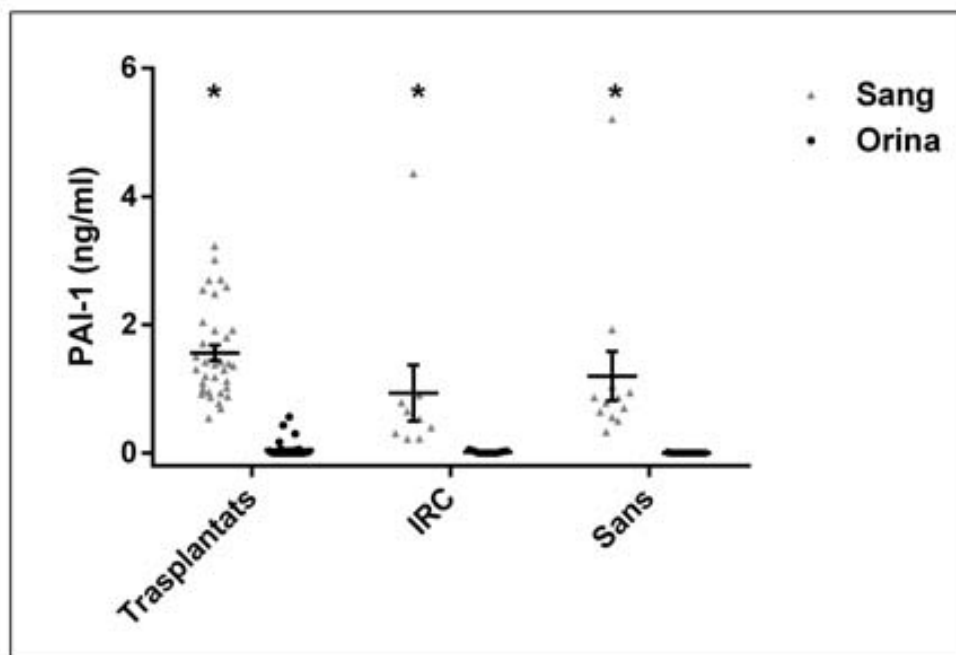


Figura 23. **PAI-1 podria aparèixer en orina per efecte de la proteïnúria que presenten alguns pacients trasplantats de ronyó.** En el gràfic es representen els nivells de PAI-1 en sang comparats amb els nivells de PAI-1 urinaris en cada grup. Per tal de poder realitzar la comparació s'ha utilitzat les dades obtingudes en orina sense corregir (ng/ml). Els valors s'expressen com a mitjana \pm SEM. S'han analitzat les dades per ANOVA bifactorial (grup i fluid) i s'han comparat els nivells de PAI-1 sanguinis respecte els nivells urinaris en cada grup utilitzant la correcció de Bonferroni (*, $p < 0.05$).

En un anàlisi posterior, es van considerar tant sols aquells pacients trasplantats renals que presentaven nivells de PAI-1 superiors al límit de detecció de l'assaig (PAI-1 > 0.0625 ng/ml). En aquestes condicions es va observar que els nivells de PAI-1 en orina correlacionaven de forma directa i amb un nivell de confiança major al 99% amb PAI-1 en sang ($p < 0.01$, Taula 27). Aquesta correlació és relativament forta ja que presenta un coeficient correlació de 0.67. Aquest fet reforçaria la idea de que PAI-1 en orina provindria de la sang.

Taula 27. **Model de correlació entre els nivells de PAI-1 en orina i de PAI-1 en sang per a pacients amb nivells de PAI-1 en orina dins el límit de detecció.** A la part superior de la taula s’hi mostra l’equació del model lineal proposat i els paràmetres associats. El coeficient de correlació indica el grau de correlació existent entre les dos variables, com més proper a 1 més forta és la relació entre variables. R^2 i R^2 ajustat pels graus de llibertat indiquen quin percentatge de la variabilitat explica el model. Mitjançant l’estadístic de Durbin-Watson s’examinen els residus per tal de determinar si l’ordre en que s’han introduït les dades afecta de forma significativa el model proposat ($\alpha=0.05$). A la part inferior, s’hi mostra l’anàlisi de la variància. Donat que el valor p és menor a 0.01 existeix una relació estadísticament significativa entre els dos factors.

		Correlació PAI-1 orina vs PAI-1 sang (ng/ml)		
		<i>Anàlisi de regressió lineal simple</i>		
	Paràmetre	Estimació	Estadístic T	Valor P
	Ordenada	-0.194	-1.999	0.065
	Pendent	0.249	3.401	0.004
		<i>Model de regressió lineal simple</i>		
	Equació del model lineal	PAI orina= -0.194 + 0.249 x PAI sang		
	Coeficient de correlació	0.67		
	R^2 (%)	45.24		
	R^2 ajustat pels graus de llibertat (%)	41.33		
	Estadístic de Durbin-Watson	2.188, p=0.31		
		<i>Anàlisi de la variància</i>		
	Freqüència	15		
	Coeficient F	11.57		
	Nivell de significança (α)	0.05		
	Valor P	0.0043, significatiu		

5.2. DETECCIÓ DE FASCINA-1 EN SANG I ORINA DE PACIENTS TRASPLANTATS DE RONYÓ

Com en el cas de PAI-1, es van mesurar els nivells de Fascina-1 per assaig ELISA en plasma i orina de pacients trasplantats de ronyó, pacients amb insuficiència renal crònica i voluntaris sans. Totes les mostres es van assajar per duplicat i es van obtenir en tots els casos coeficients de variació intra i entre-assaig inferiors al 10%. L’assaig ELISA utilitzat per detectar Fascina-1 (E91757Hu, *USCN Life science inc.*) té un rang dinàmic de 0.078 ng/ml a 5 ng/ml. Al tractar-se d’una proteïna intracel·lular, no es troba descrit a la literatura la presència de Fascina-1 en sang o orina. Per tant, no és possible comparar els nivells obtinguts amb estudis d’altres autors.

A la Figura 24 (A) es mostren els nivells de Fascina-1 obtinguts en sang en els diferents grups de pacients. Considerant les dades obtingudes en el grup de voluntaris sans, els valors normals de fascina-1 en sang oscil·len entre 2.23 i 5.49 ng/ml. No existeixen diferències significatives entre els grups inclosos en l'estudi pel que fa als nivells d'aquesta proteïna en sang (Figura 24).

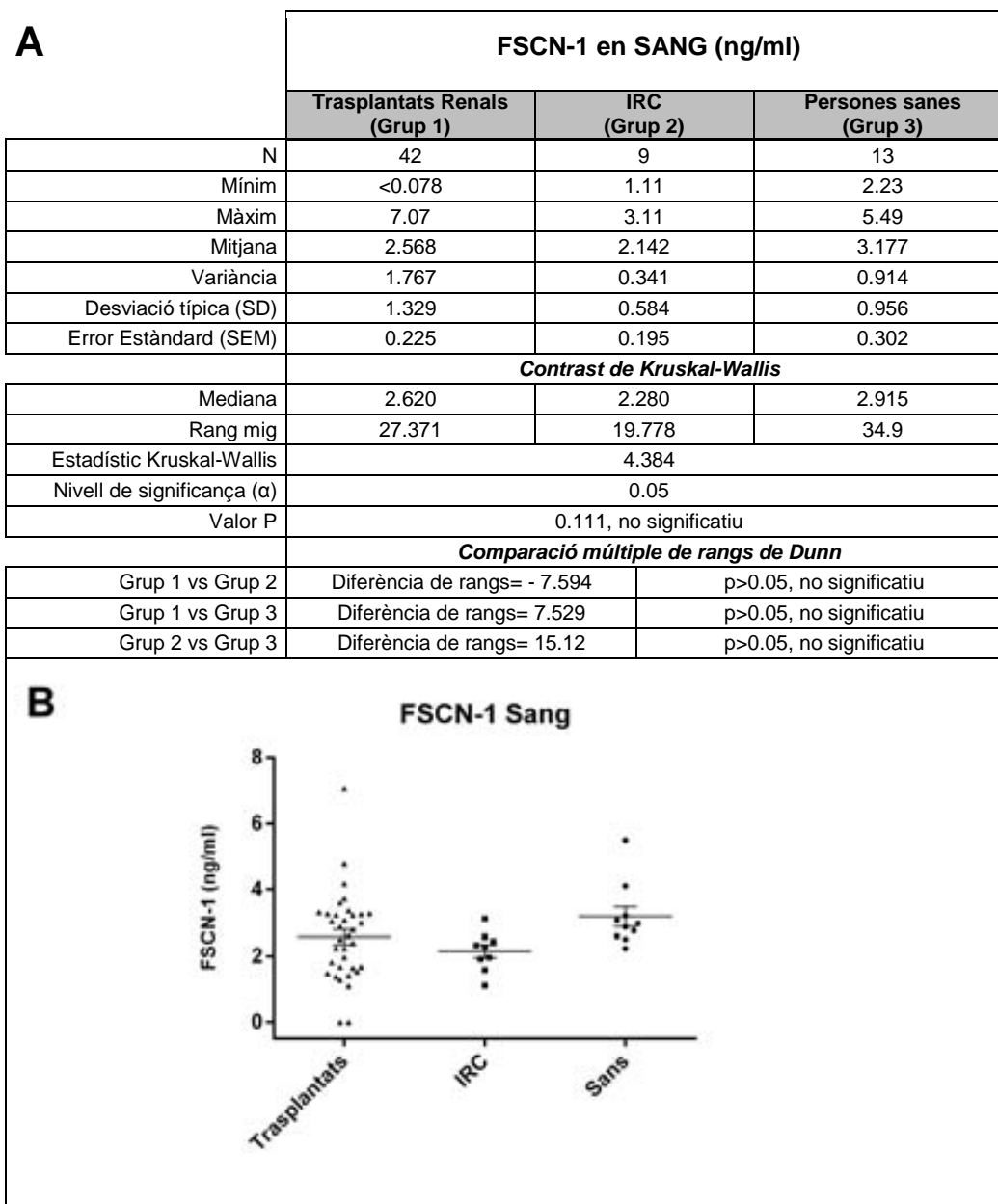


Figura 24. **Nivells de Fascina-1 en sang (ng/ml) del grup de pacients trasplantats de ronyó, dels pacients amb insuficiència renal crònica (IRC) i dels individus sans.** No hi ha diferències significatives pel que fa als nivells de Fascina-1 en sang entre els grups. En la taula superior (A), es mostra la estadística descriptiva (valor mínim i màxim, la mitjana, la mediana, la variància, la desviació típica i l'error estàndard de cada grup) i inferencial (contrast de Kruskal-Wallis i les comparacions múltiples de Dunn) dels nivells de Fascina-1 en sang dels 3 grups. Les dades de la taula es troben representades al gràfic B on els valors s'expressen com a mitjana ± SEM.

Seguidament es van analitzar els nivells de Fascina-1 en orina dels diferents grups de pacients que es mostren a la Taula 28. En orina, la majoria dels voluntaris sans no presenten nivells apreciables de Fascina-1, encara que el valor màxim obtingut és de 44.6 ng/ml (Taula 28), unes 10 vegades superior als nivells mitjos sanguinis (Figura 24, A). Els valors més elevats d'aquesta proteïna en orina s'obtenen en el grup de pacients trasplantats de ronyó (Taula 28).

Taula 28. **Estadística descriptiva dels nivells de Fascina-1 (ng/ml) en orina dels 3 grups: pacients trasplantats de ronyó, pacients amb insuficiència renal crònica i voluntaris sans.** A la part superior de la taula s'hi reflecteixen el valor mínim i màxim, la mitjana, la variància, la desviació típica i l'error estàndard de cada grup. Per poder donar un valor de mitjana i variància, els valors inferiors al límit de detecció de l'assaig (FSCN-1 < 0.078 ng/ml) s'han expressat com a 0.

	FSCN-1 en ORINA (ng/ml)		
	Trasplantats Renals (Grup 1)	IRC (Grup 2)	Persones sanes (Grup 3)
N	42	9	13
Mínim	< 0.078	< 0.078	< 0.078
Màxim	200.0	77.6	44.6
Mitjana	32.509	17.931	10.608
Variància	2166.68	715.043	162.214
Desviació típica (SD)	46.547	26.740	12.736
Error Estàndard (SEM)	7.182	8.913	3.532

Igual que en l'apartat anterior, les dades obtingudes en orina s'han referit als nivells de creatinina en orina. Un cop estandarditzades i analitzades les dades es pot observar que de mitjana els pacients trasplantats mostraven nivells més elevats de Fascina-1 en orina. Tot i això, no existien diferències significatives entre aquest grup de pacients i la resta de grups, probablement, a causa de la elevada variància en el grup de pacients trasplantats de ronyó (Figura 25).

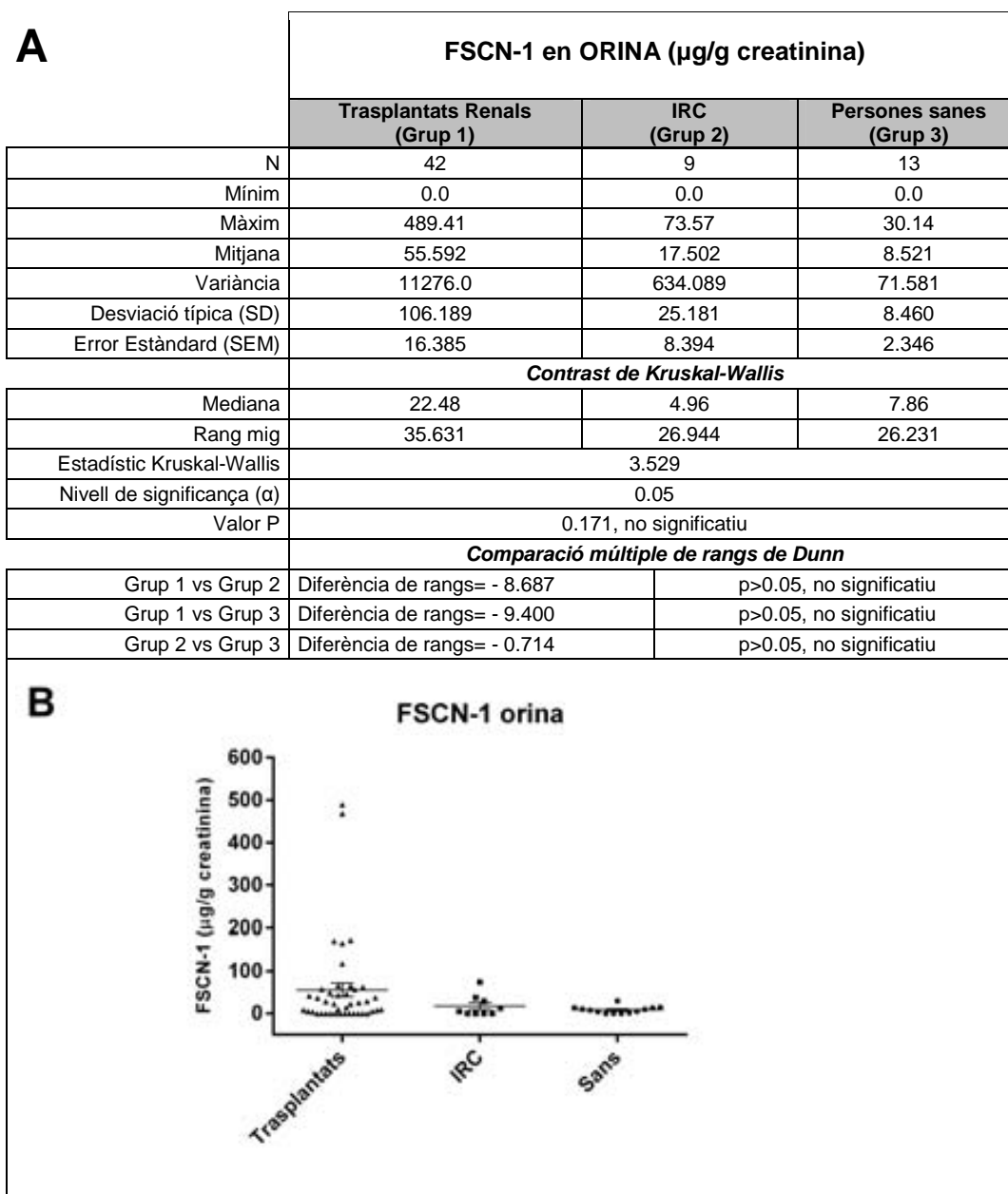


Figura 25. Nivells de Fascina-1 en orina ($\mu\text{g/g}$ creatinina) del grup de pacients trasplantats de ronyó, dels pacients amb insuficiència renal crònica (IRC) i dels individus sans. No hi ha diferències significatives pel que fa als nivells de Fascina-1 en orina entre els grups. A la taula superior (A), es mostra la estadística descriptiva (valor mínim i màxim, la mitjana, la mediana, la variància, la desviació típica i l'error estàndard de cada grup) i inferencial (contrast de Kruskal-Wallis i les comparacions múltiples de Dunn) dels nivells de Fascina-1 en orina dels 3 grups. Les dades de la taula es troben representades al gràfic B on els valors s'expressen com a mitjana \pm SEM.

5.2.1. Comparació dels nivells de Fascina-1 urinaris amb els de Fascina-1 sanguinis

De la mateixa forma que per PAI-1, es van comparar els nivells sanguinis de Fascina-1 amb els nivells de Fascina-1 en orina sense referir a la concentració de creatinina urinària en cada grup (Figura 26).

Com es pot observar a la Figura 26, els pacients trasplantats renals presentaven nivells de Fascina-1 en orina significativament més elevats que en sang. Aquests resultats, per les raons prèviament exposades, suggereixen que aquesta proteïna no apareix en orina per increment de la permeabilitat glomerular sinó per efecte renal.

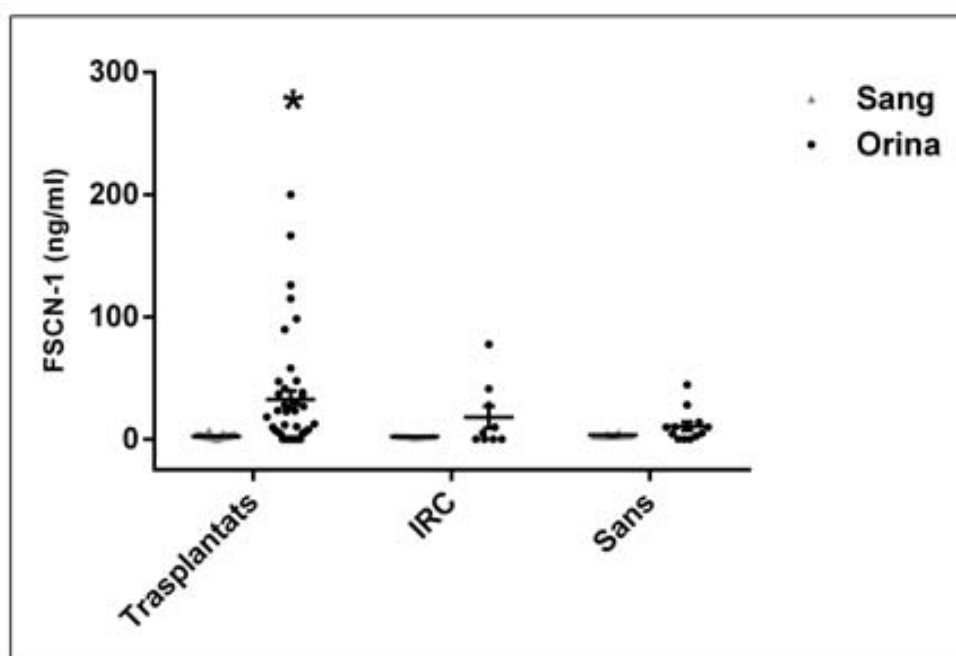


Figura 26. **Fascina-1 probablement apareix a la orina per un procés independent de la pèrdua de proteïnes plasmàtiques en els pacients trasplantats de ronyó.** En el gràfic es representen els nivells de Fascina-1 en sang comparats amb els nivells de Fascina-1 urinaris en cada grup. Per tal de poder realitzar la comparació s'ha utilitzat les dades obtingudes en orina sense corregir (ng/ml). Els valors s'expressen com a mitjana \pm SEM. S'han analitzat les dades per ANOVA bifactorial (grup i fluid) i s'han comparat els nivells de PAI-1 sanguinis respecte els nivells urinaris en cada grup utilitzant la correcció de Bonferroni (*, $p < 0.05$).

En el grup de pacients trasplantats de ronyó, es van correlacionar els nivells urinaris amb els nivells sanguinis de Fascina-1 considerant únicament aquells pacients que tenien valors mesurables d'aquesta proteïna en orina (FSCN-1 > 0.078 ng/ml). Com mostren les dades de la Taula 29, el model lineal proposat explica un

ínfim percentatge de la variabilitat de Fascina-1 en orina (R^2 ajustat= -1.5%). La correlació entre els dos factors és molt dèbil i no significativa (Taula 28) per tant, els nivells de Fascina-1 en orina no es poden explicar pels nivells sanguinis d'aquesta. Aquest fet, recolza la idea que Fascina-1 en orina és produïda pel ronyó i no és d'origen plasmàtic.

Taula 29. **Model de correlació simple entre els nivells de FSCN-1 en orina i de FSCN-1 en sang.** A la part superior de la taula s'hi mostra l'equació del model lineal proposat i els paràmetres associats. El coeficient de correlació indica el grau de correlació existent entre les dos variables, com més proper a 1 més forta és la relació entre variables. R^2 i R^2 ajustat pels graus de llibertat indiquen quin percentatge de la variabilitat explica el model. Mitjançant l'estadístic de Durbin-Watson s'examinen els residus per tal de determinar si l'ordre en que s'han introduït les dades afecta de forma significativa el model proposat ($\alpha=0.05$). A la part inferior, s'hi mostra l'anàlisi de la variància. Donat que el valor p és superior a 0.05 no existeix una relació estadísticament significativa entre els dos factors.

Correlació FSCN-1 orina vs FSCN-1 sang (ng/ml)			
<i>Anàlisi de regressió lineal simple</i>			
Paràmetre	Estimació	Estadístic T	Valor P
Ordenada	108.043	2.014	0.054
Pendent	-3.656	-0.771	0.448
<i>Model de regressió lineal simple</i>			
Equació del model lineal	uFSCN-1 = 108.04 – 13.65 * sFSCN-1		
Coeficient de correlació	-0.149		
R^2 (%)	2.236		
R^2 ajustat pels graus de llibertat (%)	-1.524		
Estadístic de Durbin-Watson	2.205, $p=0.287$		
<i>Anàlisi de la variància</i>			
Freqüència	27		
Coeficient F	0.59		
Nivell de significança (α)	0.05		
Valor P	0.448, no significatiu		

5.3. CORRELACIÓ DELS NIVELLS PAI-1 I FASCINA-1 EN SANG I EN ORINA AMB MARCADORS DE DISFUNCIÓ RENAL CONEGUTS.

Un cop detectades PAI-1 i Fascina-1 en mostres de pacients trasplantats, es van correlacionar els nivells de PAI-1 o Fascina-1 en sang o orina amb marcadors de funció renal coneguts amb l'objectiu de determinar si aportaven o no informació nova com a biomarcador de dany renal. Els marcadors utilitzats en l'anàlisi van ser: nivells de creatinina sèrica, proteïnúria i nivells de KIM-1 i NGAL en orina.

5.3.1. Valoració dels nivells de creatinina sèrica i la proteïnúria en els diferents grups de pacients

Els nivells creatinina sèrica i el contingut proteic de la orina s'han mesurat al servei de bioquímica del l'Hospital Vall d'Hebrón mitjançant la reacció de *Jaffe* i el mètode del pirogal-lol, respectivament. El rang normal de creatinina sèrica és de 0.7 a 1.3 mg/dl per als homes i de 0.6 a 1.1 mg/dl per a les dones. El contingut proteic de la orina d'individus sans és inferior a 1.5 g/dia en general.

Les dades de la Figura 27 (A) confirmen que els indicadors de dany renal clàssics es troben dins els rangs esperats en cada un dels grups. Els voluntaris sans presentaven uns nivells de creatinina sèrica de 0.55 a 0.98 mg/dl amb valor mig de 0.761mg/dl. Com és d'esperar, els pacients trasplantats de ronyó (amb una mitjana de 2.9 mg/dl) i els pacients amb dany renal crònic (amb una mitjana de 3.02 mg/dl) tenien valors de creatinina sèrica significativament més elevats que el grup de controls sans (Figura 27, A i B). Pel que fa la presència de proteïnes en orina, el grup de voluntaris sans presentaven nivells molt baixos de proteïnes en orina, de 0.0094 a 0.125 g/dia amb la mitjana de 0.056 g/dia. Els pacients trasplantats renals i els pacients que amb dany renal crònic van presentar valors significativament superiors als individus sans, amb mitjanes de 0.772 i 0.712 g/dia, respectivament (Figura 27, A i C).

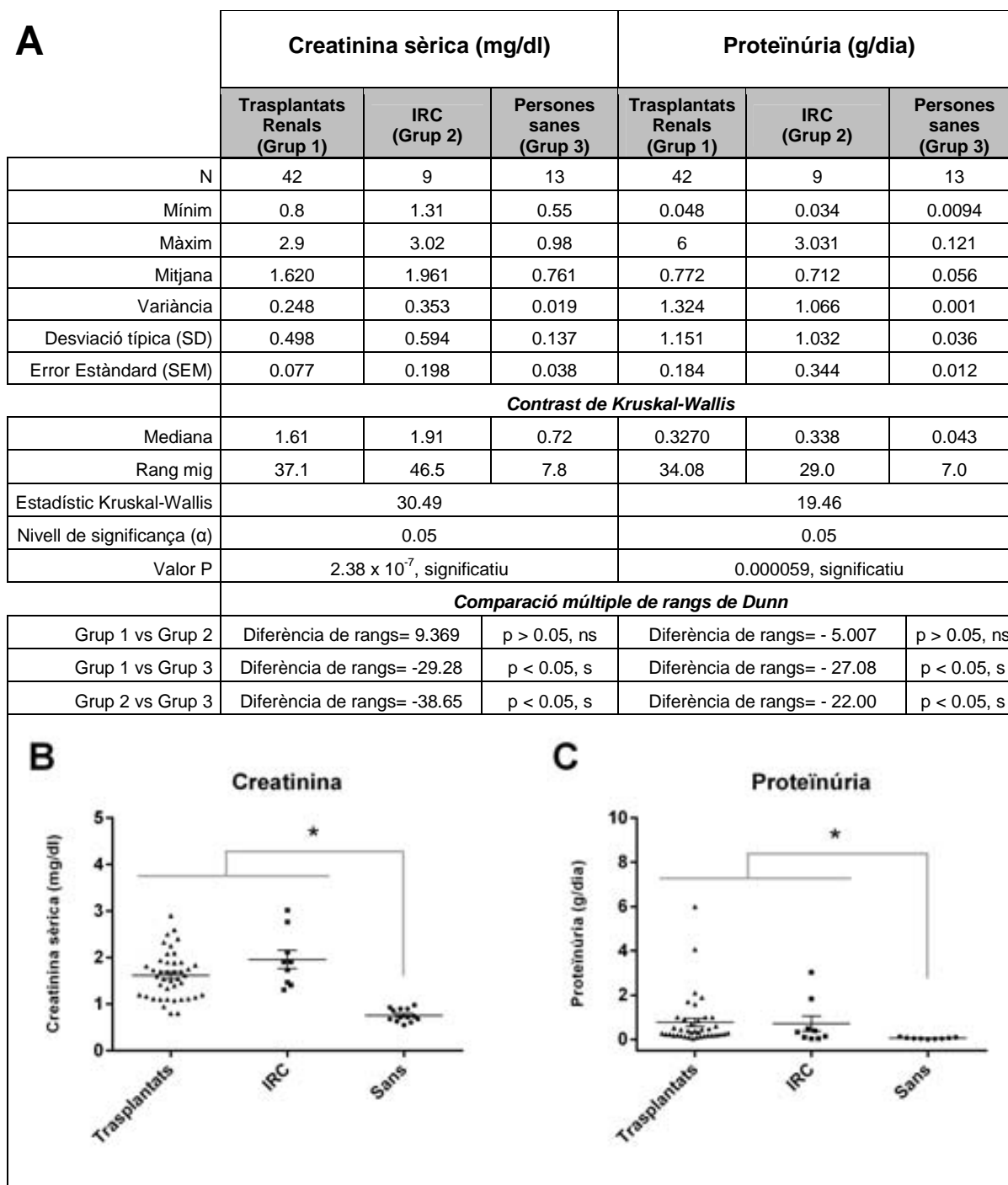


Figura 27. Nivells de creatinina sèrica (mg/dl) i de proteïnúria (g/dia) en els pacients trasplantats de ronyó, els pacients amb insuficiència renal crònica (IRC) i individus sans. Els pacients trasplantat de ronyó i amb isuficiència renal crònica mostren nivells de creatinina sèrica (C) i proteïnúria (B) més elevats que els individus sans. A la taula superior (A), es mostra la estadística descriptiva (valor mínim i màxim, la mitjana, la mediana, la variància, la desviació típica i l'error estàndard de cada grup) i inferencial (contrast de Kruskal-Wallis i les comparacions múltiples de Dunn) dels nivells de creatinina sèrica i proteïnúria dels 3 grups. Les dades de la taula es troben representades en els gràfics B (creatinina sèrica) i C (proteïnúria) on els valors s'expressen com a mitjana \pm SEM (*, p < 0.05).

5.3.2. Valoració dels nivells urinaris de KIM-1 i NGAL en els diferents grups de pacients

Els nivells de KIM-1 i NGAL en orina es van mesurar per assaig ELISA. En tots els casos, les mostres es van assajar per duplicat obtenint coeficients de variació intra i entre-assaig no superiors al 10%. A la Taula 30 es mostren el rang dinàmic i els valors esperats en orina en cada cas.

Taula 30. Kits ELISA utilitzats per detectar KIM-1 i NGAL en orina, rang dinàmic de cada un d'ells i valors esperats en orina d'individus sans i de pacients amb dany renal agut.

Kit ELISA (Referència)	Rang dinàmic	Valors esperats en orina d'individus sans	Valors esperats en orina de pacients amb dany renal agut.
KIM-1 (human TIM-1/KIM-1/HAVCR, R&D ref. DKM100)	0.156 – 10 ng/ml	0.225 - 3.20 µg /g creatinina	> 3.20 µg /g creatinina
NGAL (Bioporto Diagnostics, KIT 036)	10 - 1000 pg/ml	0.7 - 9.8 ng/ml	110 - 40000 ng/ml

Pel que fa a la concentració de NGAL en orina, els valor obtinguts en voluntaris sans són superiors als esperats (Taula 30), obtenint-se un rang de concentracions de 1.43 a 38.19 ng/ml amb mitjana de 20.40 ng/ml (Taula 31). Els nivells de NGAL obtinguts en el grup de pacients trasplantats de ronyó i en el grup de pacients amb dany renal crònic presenten un rang ampli de 2.12 a 400 ng/ml i de 1.65 a 399.7 ng/ml, respectivament (Taula 31).

Referent als nivells de KIM-1 en orina, la casa comercial indica els valors esperats en individus sans referits als nivells de creatinina urinària. Atenent a les dades estandarditzades recollides a la Figura 28 (A), la concentració mitjana de KIM-1 en orina en voluntaris sans és de 0.282 µg/g creatinina, per tant, es troba dins el rang esperat (Taula 30).

Taula 31. **Estadística descriptiva dels nivells de KIM-1 (ng/ml) i de NGAL (ng/ml) en orina dels 3 grups: pacients trasplantats de ronyó, pacients amb insuficiència renal crònica (IRC) i voluntaris sans.** A la taula s'hi reflecteixen el valor mínim i màxim, la mitjana, la variància, la desviació típica i l'error estàndard de cada grup. Per les dades de KIM-1, per poder donar un valor de mitjana i variància, els valors inferiors al límit de detecció de l'assaig (KIM-1 < 0.156 ng/ml) s'han expressat com a 0.

	KIM-1 orina (ng/ml)			NGAL orina (ng/ml)		
	Trasplantats Renals (Grup 1)	IRC (Grup 2)	Persones sanes (Grup 3)	Trasplantats Renals (Grup 1)	IRC (Grup 2)	Persones sanes (Grup 3)
N	42	9	13	42	9	13
Mínim	< 0.156 ng/ml	< 0.156 ng/ml	< 0.156 ng/ml	2.18	1.65	1.43
Màxim	3.42	0.43	0.89	400	399.77	38.19
Mitjana	0.780	0.255	0.377	73.895	57.019	20.403
Variància	0.781	0.029	0.091	9319.11	16631.3	160.531
Desviació típica (SD)	0.884	0.171	0.301	96.536	128.962	12.67
Error Estàndard (SEM)	0.136	0.057	0.100	14.896	42.987	4.789

De la mateixa forma que per PAI-1 i Fascina-1 es van referir els valors obtinguts en orina als nivells de creatinina urinària. Els nivells de KIM-1 i de NGAL en orina, un cop estandarditzats, presenten una variància en el grup de pacients amb dany renal crònic semblant a la del grup d'individus sans cosa que indica homogeneïtat dins de cada grup. En canvi, la variància és major en el grup de pacients trasplantats de ronyó cosa que indica que existeix una certa heterogeneïtat en quant a funció renal en aquest grup (Figura 28, A).

Tant KIM-1 com NGAL es troben en major concentració en l'orina de pacients trasplantats que en la resta de grups ja que són marcadors de dany tubular agut. Aquest tipus de dany no es manifesta en pacients amb dany renal crònic, per tant, no s'observen diferències en quant als nivells urinaris de KIM-1 i NGAL entre pacients amb dany renal crònic i individus sans (Figura 28).

A

	KIM-1 orina ($\mu\text{g/g}$ creatinina)			NGAL orina ($\mu\text{g/g}$ creatinina)		
	Trasplantats Renals (Grup 1)	IRC (Grup 2)	Persones sanes (Grup 3)	Trasplantats Renals (Grup 1)	IRC (Grup 2)	Persones sanes (Grup 3)
N	42	9	13	42	9	13
Mínim	0.0	0.0	0.0	10.91	4.43	2.87
Màxim	6.25	0.7	0.6	925.92	34.77	35.34
Mitjana	1.051	0.328	0.282	128.178	14.337	18.66
Variància	1.575	0.061	0.039	36916.7	103.708	150.658
Desviació típica (SD)	1.255	0.247	0.197	192.137	10.184	12.274
Error Estàndard (SEM)	0.194	0.082	0.066	29.647	3.600	4.63
Contrast de Kruskal-Wallis						
Mediana	0.59	0.29	0.28	42.60	11.93	22.08
Rang mig	34.369	22.833	20.111	34.619	12.25	17.0
Estadístic Kruskal-Wallis	6.999			11.866		
Nivell de significança (α)	0.05			0.05		
Valor P	0.0301, significatiu			0.0026, significatiu		
Comparació múltiple de rangs de Dunn						
Grup 1 vs Grup 2	Diferència de rangs= - 11.54	$p > 0.05$, ns	Diferència de rangs= - 22.37	$p < 0.05$, s		
Grup 1 vs Grup 3	Diferència de rangs= - 14.26	$p < 0.05$, s	Diferència de rangs= - 14.74	$p < 0.05$, s		
Grup 2 vs Grup 3	Diferència de rangs= - 2.722	$p > 0.05$, ns	Diferència de rangs= 7.625	$p > 0.05$, ns		

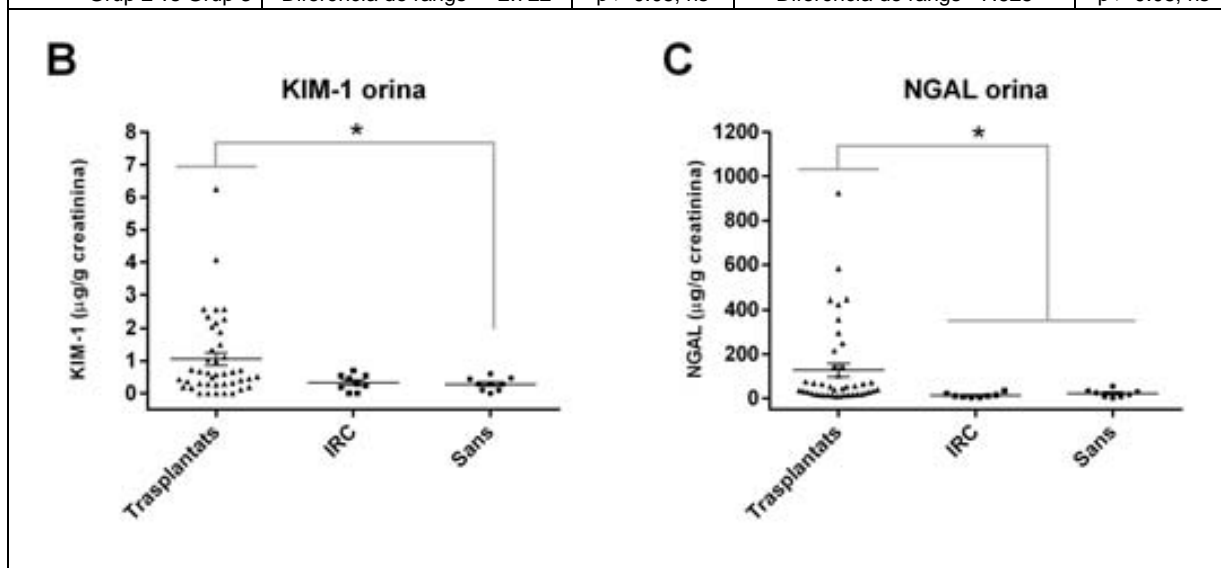


Figura 28. Nivells de KIM-1 i de NGAL en orina ($\mu\text{g/g}$ creatinina) en els pacients trasplantats de ronyó, els pacients amb insuficiència renal crònica (IRC) i individus sans. Els pacients trasplantats de ronyó mostren nivells urinaris de KIM-1 (C) i NGAL (B) més elevats que els pacients amb dany renal crònic (IRC) i que els individus sans. A la taula superior (A), es mostra la estadística descriptiva (valor mínim i màxim, la mitjana, la mediana, la variància, la desviació típica i l'error estàndard de cada grup) i inferencial (contrast de Kruskal-Wallis i les comparacions múltiples de Dunn) dels nivells de creatinina sèrica i proteïnúria dels 3 grups. Les dades de la taula es troben representades en els gràfics B (nivells de KIM-1 urinaris) i C (nivells de NGAL urinaris) on els valors s'expressen com a mitjana \pm SEM (*, $p < 0.05$).

5.3.3. Correlació de PAI-1 en sang i en orina amb marcadors de funció renal coneguts

Per tal de determinar si la presència de PAI-1 en orina i plasma de pacients trasplantats correlacionava amb algun dels marcadors de dany renal existents, es van relacionar els valors de PAI-1 en aquest grup amb la creatinina sèrica, el contingut proteic de la orina i els nivells urinaris de KIM-1 i NGAL determinats en els apartats anteriors. Es van testar diversos models de regressió múltiple per tal de descriure la relació d'un o més factors amb els nivells de PAI-1 en orina i en plasma. L'estadístic R^2 ajustat mesura quina proporció de la variabilitat d'una variable és explicada pels factors del model. La Figura 29 mostra l' R^2 ajustat pels graus de llibertat dels diferents models proposats. Com s'hi pot observar, el model de regressió lineal múltiple que explica més variabilitat dels nivells de PAI-1 en sang s'aconsegueix considerant els nivells de creatinina sèrica i de KIM-1 en orina (Figura 29, model AD). És a dir, aquestes dues variables podrien explicar part de la variabilitat de PAI-1 en sang.

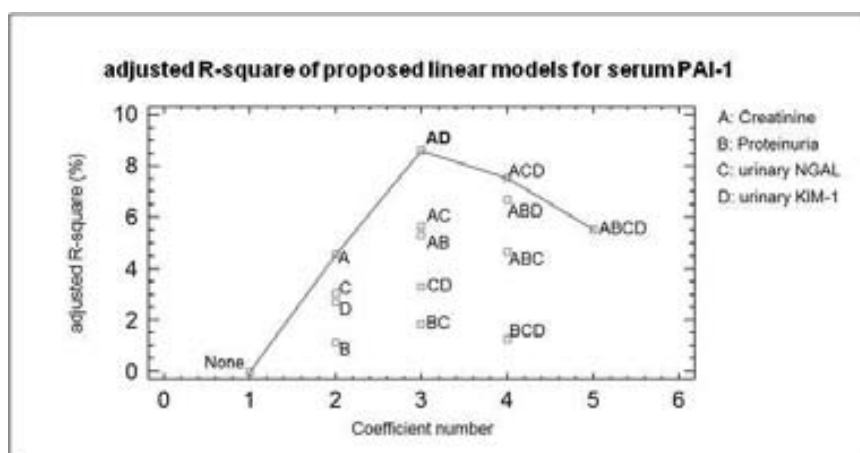


Figura 29. **Els nivells de creatinina sèrica i de KIM-1 urinaris expliquen part de la variabilitat de PAI-1 en sang.** Considerant el grup de pacients trasplantats de ronyó, s'han generat diversos models de regressió lineal múltiple per tal de veure si existeix una relació entre PAI-1 en sang amb els nivells de creatinina sèrica, proteïnúria i els nivells de KIM-1 i NGAL en orina. El gràfic mostra el percentatge de variabilitat explicada (R^2 ajustat pels graus de llibertat) de PAI-1 en sang per cada una de les combinacions de les variables. El model lineal múltiple que més variabilitat (R^2 ajustat=9.4%) de PAI-1 en sang explica és considerant els nivells de creatinina sèrica i la concentració de KIM-1 en orina (model AD).

A la Taula 32 s'ha desenvolupat el model de regressió lineal múltiple que explicava major variabilitat de PAI-1 en sang en els pacients trasplantats de ronyó: el

model AD (Figura 29). L'equació del model proposat és la següent: $sPAI-1=2.411-0,422*creatinina-0,139*uKIM-1$. Tot i que el model explica tant sols sobre un 10% de la variabilitat dels nivells de PAI-1 en sang (R^2 ajustat=9,4), existeix una forta tendència ($p = 0.078 < 0.1$) en la relació entre els nivells de PAI-1 en sang i les variables del model. Analitzant els factors per separat, existeix una relació entre els nivells de PAI-1 en plasma i els nivells de creatinina sèrica amb un nivell de confiança del 90 % ($p = 0.07$), però no amb els de KIM-1 en orina ($p = 0,12$) (Taula 32). És a dir, el factor “Nivells de KIM-1 urinaris” es pot eliminar del model ja que no influeix de manera significativa en els nivells de PAI-1 en sang.

Taula 32. **Model de correlació lineal múltiple entre els nivells de PAI-1 en sang, els nivells de creatinina sèrica i de KIM-1 urinari.** A la part superior de la taula s'hi mostra l'equació del model lineal múltiple proposat i els paràmetres associats. R^2 i R^2 ajustat pels graus de llibertat indiquen quin percentatge de la variabilitat explica el model. Mitjançant l'estadístic de Durbin-Watson s'examinen els residus per tal de determinar si l'ordre en que s'han introduït les dades afecta de forma significativa el model proposat ($\alpha=0.05$). A la part inferior, s'hi mostra l'anàlisi de la variància i l'anàlisi de regressió múltiple. Donat que el valor p es troba entre 0.05 i 0.1 en l'anàlisi de variància existeix una relació mitjanament significativa entre els factors del model. *sPAI-1: nivells en sang de PAI-1, uKIM-1: nivells de KIM-1 en orina.*

Correlació PAI-1 sang (ng/ml) amb creatinina sèrica (mg/dl) i KIM-1 urinari (µg/g creatinina)			
<i>Anàlisi de regressió múltiple</i>			
Paràmetre	Estimació	Estadístic T	Valor P
Constant	2.4107	5.906	0.0000
Creatinina sèrica	-0.422	-1.85	0.0736
Nivells KIM-1 orina	-0.139	-1.579	0.1242
<i>Model de regressió múltiple</i>			
Equació del model lineal múltiple	$sPAI-1=2.411-0,422*creatinina-0,139*uKIM-1$		
R^2 (%)	14.7		
R^2 ajustat pels graus de llibertat (%)	9.37		
Valor P de l'estadístic de Durbin-Watson	0.103		
<i>Anàlisi de la variància</i>			
Freqüència	42		
Coeficient F	2.76		
Nivell de significança (α)	0.05		
Valor P	0.078, no significatiu (Tendència)		

Considerant que el factor “Nivells de KIM-1 en orina” es podia eliminar del model, es va aplicar un model de regressió lineal simple per establir una relació entre els nivells sanguinis de PAI-1 i els nivells de creatinina sèrica . Com s’observa a la Taula 33, els nivells sanguinis de PAI-1 tendeixen (valor P < 0.1) a relacionar-se de forma inversament proporcional (coeficient de correlació = - 0,27) amb els nivells de creatinina sèrica. Donat que el model explica un percentatge baix dels nivells de PAI-1 en plasma (R^2 ajustat = 5,2), la relació entre els factors del model és dèbil. Tot i això, la correlació negativa entre ells suggeriria que nivells elevats de PAI-1 en sang de pacients trasplantats de ronyó podrien indicar bona funció renal en aquest grup de pacients.

Taula 33. **Model de correlació lineal simple entre els nivells de PAI-1 en sang i nivells de creatinina sèrica.** A la part superior de la taula s’hi mostra l’equació del model lineal proposat i els paràmetres associats. El coeficient de correlació indica el grau de correlació existent entre les dos variables, com més proper a 1 més forta és la relació entre variables. R^2 i R^2 ajustat pels graus de llibertat indiquen quin percentatge de la variabilitat explica el model. Mitjançant l’estadístic de Durbin-Watson s’examinen els residus per tal de determinar si l’ordre en que s’han introduït les dades afecta de forma significativa el model proposat ($\alpha=0.05$). A la part inferior, s’hi mostra l’anàlisi de la variància. Donat que el valor p es troba entre 0.05 i 0.1 existeix una relació mitjanament significativa entre els factors. *sPAI-1: nivells en sang de PAI-1.*

		Correlació PAI-1 sang vs Creatinina sèrica		
		<i>Anàlisi de regressió lineal simple</i>		
Paràmetre	Estimació	Estadístic T	Valor P	
Ordenada	2.197	5.581	0.000	
Pendent	- 0.396	- 1.700	0.098	
		<i>Model de regressió lineal simple</i>		
Equació del model lineal	sPAI-1=2,197-0,396*creatinina			
Coeficient de correlació	-0,284			
R^2 (%)	8.0556			
R^2 ajustat pels graus de llibertat (%)	5.2694			
Valor P de l’estadístic de Durbin-Watson	0.0631			
		<i>Anàlisi de la variància</i>		
Freqüència	42			
Coeficient F	2.89			
Nivell de significança (α)	0.05			
Valor P	0.0985, no significatiu (Tendència)			

Pel que fa als nivells de PAI-1 en orina, el model que més variabilitat explica d'aquesta variable és considerant la proteïnúria, els nivells de NGAL i KIM-1 en orina. Sobre un 60% de la variabilitat en els nivells de PAI-1 en orina es pot explicar per aquests tres factors (Model BCD de la Figura 30).

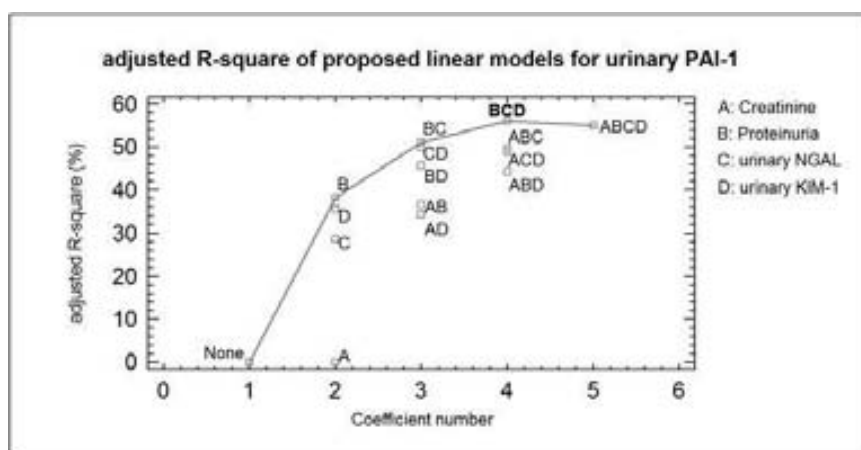


Figura 30. La proteïnúria, els nivells de KIM-1 i NGAL en orina expliquen més del 50% de la variabilitat de PAI-1 en orina. Considerant el grup de pacients trasplantats de ronyó, s'han generat diversos models de regressió lineal múltiple per tal de veure si existeix una relació entre PAI-1 en sang amb els nivells de creatinina sèrica, proteïnúria i els nivells de KIM-1 i NGAL en orina. El gràfic mostra el percentatge de variabilitat explicada (R^2 ajustat pels graus de llibertat) de PAI-1 en orina per cada una de les combinacions de les variables. El model que més variabilitat de PAI-1 en orina explica (R^2 ajustat=56.29 %) és considerant la proteïnúria i els nivells de KIM-1 i NGAL en orina (model BCD).

El model de regressió lineal múltiple proposat per PAI-1 en orina és: $uPAI-1 = -0.053 + 0.00028 * NGAL + 0.039 * KIM-1 + 0.042 * proteïnúria$ (Figura 30, Model BCD). Com es mostra a la Taula 34, tots els factors del model es troben fortament relacionats amb els nivells de PAI-1 en orina tant en el model general ($p = 0.000$) com analitzats individualment (Taula 34). A la Figura 30 també es pot apreciar que sobre un 40% de la variabilitat de PAI-1 en orina es pot explicar sols tenint en compte el factor proteïnúria (Figura 30, Model B).

Taula 34. **Model de correlació lineal múltiple entre els nivells de PAI-1 en orina i els nivells de NGAL i KIM-1 urinaris i la proteïnúria.** A la part superior de la taula s'hi mostra l'equació del model lineal múltiple proposat i els paràmetres associats. R^2 i R^2 ajustat pels graus de llibertat indiquen quin percentatge de la variabilitat explica el model. Mitjançant l'estadístic de Durbin-Watson s'examinen els residus per tal de determinar si l'ordre en que s'han introduït les dades afecta de forma significativa el model proposat ($\alpha=0.05$). A la part inferior, s'hi mostra l'anàlisi de la variància i l'anàlisi de regressió múltiple. Donat que el valor p és menor a 0.05 en l'anàlisi de variància existeix una relació estadísticament significativa entre els factors del model. *uPAI-1: Nivells de PAI-1 en orina, uNGAL: nivells de NGAL en orina, uKIM-1: nivells de KIM-1 en orina.*

Correlació PAI-1 orina ($\mu\text{g/g}$ creatinina) amb proteïnúria (g/dia), NGAL i KIM-1 urinari ($\mu\text{g/g}$ creatinina)			
<i>Anàlisi de regressió múltiple</i>			
Paràmetre	Estimació	Estadístic T	Valor P
Constant	-0.0529	- 2.312	0.0268
Nivells urinaris NGAL	0.00028	3.105	0.0038
Nivells urinaris KIM-1	0.0396	2.477	0.0182
Proteïnúria	0.0419	2.296	0.0278
<i>Model de regressió múltiple</i>			
Equació del model lineal múltiple	$u\text{PAI-1} = -0.053 + 0.00028 \cdot u\text{NGAL} + 0.039 \cdot u\text{KIM-1} + 0.042 \cdot \text{proteïnúria}$		
R^2 (%)	59.74		
R^2 ajustat pels graus de llibertat (%)	56.29		
Valor P de l'estadístic de Durbin-Watson	0.499		
<i>Anàlisi de la variància</i>			
Freqüència	42		
Coeficient F	17.32		
Nivell de significança (α)	0.05		
Valor P	0.0000, significatiu		

El fet que gran part de la variabilitat de PAI-1 en orina es pogués explicar pel factor “*Proteïnúria*” (Figura 30) i que la presència en orina de PAI-1 fos molt inferior que en sang (Figura 23), fa pensar que PAI-1 urinari provindria de sang per efecte de la proteïnúria. Encara que PAI-1 en orina no aparegués per efecte de la proteïnúria, cal tenir en compte que correlaciona també fortament amb els nivells en orina de NGAL i KIM-1 (Taula 34). Per tant, el nivells urinaris de PAI-1 no aportarien informació nova com a biomarcador de dany renal.

Pel que fa als nivells de PAI-1 en sang, els anàlisis de correlació que es van realitzar (Taulas 32 i 33) apuntaven que nivells més elevats d'aquesta proteïna en sèrum podrien indicar una millor funció renal en el grup de pacients trasplantats de ronyó.

5.3.4. Correlació de Fascina-1 en sang i en orina amb marcadors de funció renal coneguts

De la mateixa manera que en l'apartat anterior, es van generar diversos models de regressió lineal múltiple per analitzar si els nivells de Fascina-1 en sang o orina en els pacients trasplantats de ronyó es podien explicar per alguna de les següents variables o per combinació d'elles: nivells de creatinina sèrica, contingut proteic de la orina i els nivells de KIM-1 i NGAL en orina.

El model lineal que més variabilitat explica dels nivells de Fascina-1 en sang és considerant únicament el factor "Nivells de creatinina sèrica" (Figura 31, Model A).

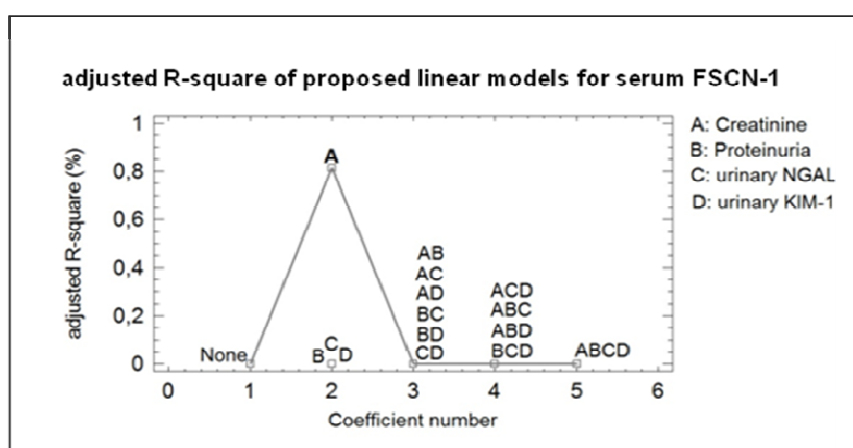


Figura 31. Els nivells de creatinina sèrica, la proteïnúria i la presència de KIM-1 o NGAL en orina expliquen poca proporció de la variabilitat de Fascina-1 en sang. Considerant el grup de pacients trasplantats de ronyó, s'han generat diversos models de regressió lineal múltiple per tal de veure si existeix una relació entre Fascina-1 en sang amb els nivells de creatinina sèrica, proteïnúria i els nivells de KIM-1 i NGAL en orina. El gràfic mostra el percentatge de variabilitat explicada (R^2 ajustat pels graus de llibertat) de Fascina-1 en sang per cada una de les combinacions de les variables. En negreta es ressaltava el model que més proporció explica de la variabilitat associada a Fascina-1 en sang.

A la Taula 35 es detalla el model de regressió lineal entre els nivells de Fascina-1 en sèrum i els nivells de creatinina sèrica. Com es pot observar el model “ $sFSCN-1 = 1.551 + 0.630 * Creatinina$ ” explica tant sols un 0.8% de la variabilitat dels nivells de Fascina-1 en sèrum. La relació entre els dos factors és mínima (coeficient de correlació = 0.2) i no significativa ($p = 0.164$). Per tant, els nivells d’aquesta proteïna en sang no es poden explicar pel factor “*Nivells de creatinina sèrica*”.

Taula 35. Model de correlació lineal simple entre els nivells de Fascina-1 en sang i els nivells de creatinina sèrica. A la part superior de la taula s’hi mostra l’equació del model lineal proposat i els paràmetres associats. R^2 i R^2 ajustat pels graus de llibertat indiquen quin percentatge de la variabilitat explica el model. Mitjançant l’estadístic de Durbin-Watson s’examinen els residus per tal de determinar si l’ordre en que s’han introduït les dades afecta de forma significativa el model proposat ($\alpha=0.05$). A la part inferior, s’hi mostra l’anàlisi de la variància i l’anàlisi de regressió múltiple. *sFSCN-1: nivells en sang de Fascina-1.*

		Correlació Fascina-1 sang (ng/ml) amb creatinina sèrica (mg/dl)		
		<i>Anàlisi de regressió lineal</i>		
Paràmetre	Estimació	Estadístic T	Valor P	
Ordenada	1.551	2.073	0.046	
Pendent	0.630	1.424	0.164	
		<i>Model de regressió múltiple</i>		
Equació del model lineal múltiple	$sFSCN-1 = 1.551 + 0.630 * Creatinina$			
Coefficient de correlació	0.241			
R^2 (%)	3.819			
R^2 ajustat pels graus de llibertat (%)	0.814			
Estadístic de Durbin-Watson	1.946, $p=0.438$			
		<i>Anàlisi de la variància</i>		
Freqüència	42			
Coefficient F	2.03			
Nivell de significança (α)	0.05			
Valor P	0.164, no significatiu			

Pel que fa a la Fascina-1 en orina, el model que explicava major variabilitat (sobre un 8%) s’obtenia considerant el contingut proteic de la orina i els nivells de KIM-1 en orina (Figura 32, Model BD).

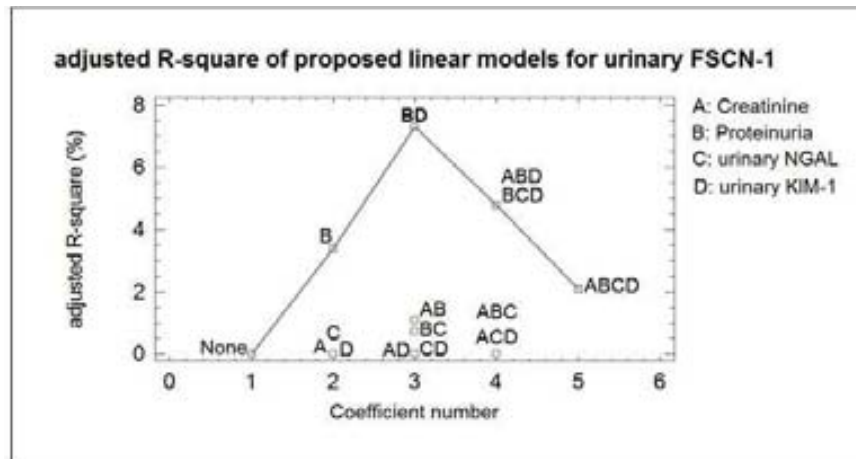


Figura 32. Els nivells de creatinina sèrica, la proteïnúria i la presència de KIM-1 o NGAL en orina expliquen poca proporció de la variabilitat de Fascina-1 en orina. Considerant el grup de pacients trasplantats de ronyó, s'han generat diversos models de regressió lineal múltiple per tal de veure si existeix una relació entre Fascina-1 en orina amb els nivells de creatinina sèrica, proteïnúria i els nivells de KIM-1 i NGAL en orina. El gràfic mostra el percentatge de variabilitat explicada (R^2 ajustat pels graus de llibertat) de Fascina-1 en orina per cada una de les combinacions de les variables. En negreta es ressaltava el model que més proporció explica de la variabilitat associada a Fascina-1 en orina.

El model de regressió lineal múltiple BD de la Figura 32, que és el que més variabilitat de Fascina-1 en orina explica, es troba detallat a la Taula 36. El model explica un 7.3 % de la variabilitat dels nivells urinaris de Fascina-1 i la relació entre les variables és significativa amb un nivell de confiança del 90 %. Tot i això, cal tenir en compte que el factor “Nivells de KIM-1 en orina” no influeix de forma significativa en el model ($p = 0.119$).

Taula 36. **Model de correlació lineal múltiple entre els nivells de Fascina-1 en orina i la proteïnúria i els nivells de KIM-1 urinaris.** A la part superior de la taula s’hi mostra l’equació del model lineal múltiple proposat i els paràmetres associats. R^2 i R^2 ajustat pels graus de llibertat indiquen quin percentatge de la variabilitat explica el model. Mitjançant l’estadístic de Durbin-Watson s’examinen els residus per tal de determinar si l’ordre en que s’han introduït les dades afecta de forma significativa el model proposat ($\alpha=0.05$). A la part inferior, s’hi mostra l’anàlisi de la variància i l’anàlisi de regressió múltiple. Donat que el valor P és menor a 0.1 en l’anàlisi de variància existeix una tendència entre els factors del model. *uFSCN-1: Nivells de Fascina-1 en orina, uKIM-1: nivells de KIM-1 en orina.*

Correlació Fascina-1 en orina ($\mu\text{g/g}$ creatinina) amb proteïnúria (g/dia) i KIM-1 urinari ($\mu\text{g/g}$ creatinina)			
<i>Anàlisi de regressió múltiple</i>			
Paràmetre	Estimació	Estadístic T	Valor P
Constant	52.499	2.330	0.025
Proteïnúria	40.159	2.203	0.034
Nivells urinaris KIM-1	-26.194	-1,599	0.119
<i>Model de regressió múltiple</i>			
Equació del model lineal múltiple	uFSCN-1= 52.5 + 40.1 * proteïnúria - 26.2 * uKIM-1		
R^2 (%)	12.177		
R^2 ajustat pels graus de llibertat (%)	7.298		
Estadístic de Durbin-Watson	2.223 (p=0.245)		
<i>Anàlisi de la variància</i>			
Freqüència	42		
Coefficient F	2.50		
Nivell de significança (α)	0.05		
Valor P	0.0966, no significatiu (Tendència)		

Tal i com s’ha esmentat, els nivells de KIM-1 en orina no inflüen de forma significativa en el model, motiu pel qual es va poder excloure aquesta variable del model. En la Taula 37 es mostra el model lineal simplificat que relaciona els nivells de Fascina-1 en orina amb el contingut proteic de la orina. Com s’hi troba reflectit, el model explica menys d’un 5 % (R^2 ajustat = 3.39 %) de la variabilitat dels nivells de Fascina-1 en orina. Els factors es relacionen de forma dèbil (coeficient de correlació = 0.244) i no significativament ($p = 0.13$). Per tant, l’aparició de Fascina-1 en orina de pacients trasplantats de ronyó no estava relacionada ni amb els nivells de KIM-1 ni amb la presència de proteïnúria.

Taula 37. **Model de correlació lineal simple entre els nivells de Fascina-1 en orina i la proteïnúria.** A la part superior de la taula s'hi mostra l'equació del model lineal proposat i els paràmetres associats. R^2 i R^2 ajustat pels graus de llibertat indiquen quin percentatge de la variabilitat explica el model. Mitjançant l'estadístic de Durbin-Watson s'examinen els residus per tal de determinar si l'ordre en que s'han introduït les dades afecta de forma significativa el model proposat ($\alpha=0.05$). A la part inferior, s'hi mostra l'anàlisi de la variància i l'anàlisi de regressió múltiple. *uFSCN-1: nivells en orina de Fascina-1.*

Correlació Fascina-1 orina ($\mu\text{g/g}$ creatinina) amb proteïnúria (g/dia)			
<i>Anàlisi de regressió lineal</i>			
Paràmetre	Estimació	Estadístic T	Valor P
Ordenada	36.543	1.772	0.084
Pendent	22.948	1.529	0.135
<i>Model de regressió múltiple</i>			
Equació del model lineal múltiple	uFSCN-1 = 36.54 + 22.95 * proteïnúria		
Coeficient de correlació	0.244		
R^2 (%)	5.941		
R^2 ajustat pels graus de llibertat (%)	3.399		
Estadístic de Durbin-Watson	2.320 (p=0.156)		
<i>Anàlisi de la variància</i>			
Freqüència	42		
Coeficient F	2.34		
Nivell de significança (α)	0.05		
Valor P	0.1348, no significatiu		

Tenint en compte el conjunt d'aquests anàlisis, podem considerar que ni els nivells de Fascina-1 en sang ni en orina es poden relacionar amb els marcadors de funció renal proposats.

5.4. RELACIÓ DELS NIVELLS DE PAI-1 I FASCINA-1 AMB LA INICACIÓ DE LA BIÒPSIA I EL DIAGNÒSTIC HISTOPATOLÒGIC SEGONS ELS CRITERIS DE BANFF

Les mostres de sang i orina dels pacients trasplantats de ronyó es van recollir prèviament a una biòpsia de l'empelt renal per tal de poder relacionar l'aparició dels possibles marcadors amb la histopatologia de l'empelt. Els nivells de PAI-1 i Fascina-1 en sang i orina que es van obtenir en aquest grup de pacients es van analitzar en funció de la indicació mèdica de la biòpsia i el diagnòstic histopatològic que es va obtenir en cada cas.

Les biòpsies de l'empelt renal es van realitzar per diverses indicacions mèdiques (les característiques clíniques de cada grup es troben detallades a la Taula 10 de Materials, Mètodes i Pacients):

- Per deteriorament agut de la funció renal o retràs de la funció de l'empelt.
- Per proteïnúria o deteriorament crònic de la funció renal.
- Per seguiment als 3 mesos post-trasplantament.

L'anàlisi histopatològic es va realitzar al servei d'anatomia patològica del nostre hospital seguint els criteris de Banff que permeten classificar les lesions de l'empelt i determinar-ne el grau⁵⁶. Per tal d'obtenir grups d'estudi més grans i facilitar l'anàlisi estadística es van agrupar els diagnòstics obtinguts en quatre categories (Figura 17 de Materials, Mètodes i Pacients):

- Normal: histologia de l'empelt normal.
- FIAT: fibrosi intersticial i atròfia tubular. Inclou els graus FIAT I, II i III de la classificació de Banff.
- Rebuig de l'empelt: S'hi ha inclòs totes les categories diagnòstiques en que s'observen canvis histològics donats per processos inflamatoris. Inclou les categories "Rebuig *borderline*", "RAH, Rebuig agut humoral" i "RCH, Rebuig crònic humoral", de qualsevol grau.

- Altres: inclou altres diagnòstics obtinguts (“necrosi tubular aguda” i “recidiva de la nefropatia primària”).

5.4.1. Relació dels nivells de PAI-1 en sang i en orina amb la indicació de la biòpsia i el diagnòstic histopatològic

Es van analitzar els nivells de PAI-1 sanguinis i urinaris en funció de la indicació de la biòpsia i del diagnòstic obtingut segons els criteris de Banff (Figura 33).

Respecte a la indicació de la biòpsia, tal i com es pot observar a la Figura 33 (B) i a la Taula 38, els nivells de PAI-1 urinaris no es trobaven relacionats amb la indicació de la biòpsia. En canvi, pel que fa als nivells de PAI-1 en sang, els pacients trasplantats als que se'ls va fer una biòpsia de seguiment als 3 mesos mostraven nivells més alts que als que se'ls va realitzar una biòpsia per deteriorament agut de la funció renal (Figura 33, A). Tot i que l'estadístic només mostra una tendència ($p = 0.053$), aquest fet reforça la idea que pacients trasplantats de ronyó amb nivells més elevats de PAI-1 tindrien millor funció de l'empelt, ja que aquest grup de pacients té millor funció renal que la resta de grups de pacients trasplantats de ronyó (Taula 10 de Materials, Mètodes i Pacients).

Pel que fa a les categories diagnòstiques de Banff, ni els nivells de PAI-1 en plasma ni en orina es van poder associar estadísticament a cap tipus de diagnòstic histopatològic seguint els criteris de Banff (Taula 38 i Figura 33, C i D).

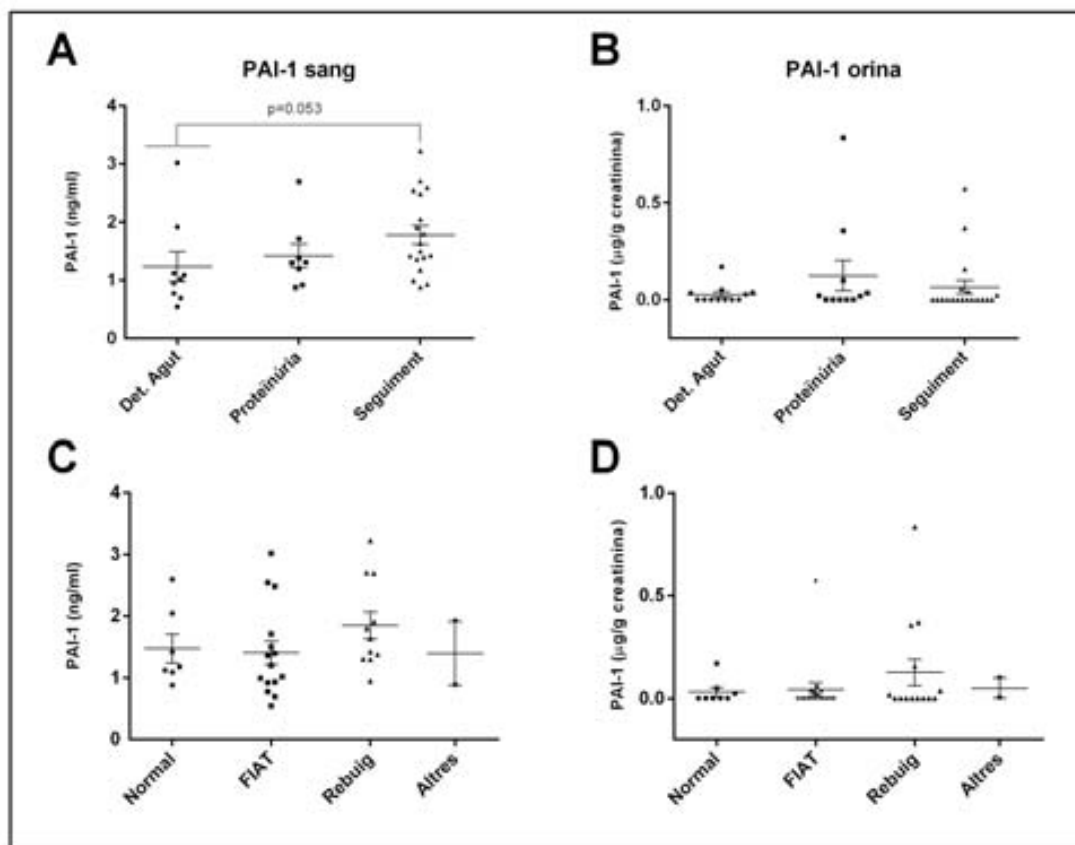


Figura 33. PAI-1 en sang és més elevat en pacients trasplantats de ronyó amb indicació de biòpsia per seguiment als 3 mesos. Els gràfics superiors mostren els nivells de PAI-1 en sang (A) i en orina (B) en els diferents grups de pacients trasplantats de ronyó en funció de la indicació de la biòpsia (deteriorament agut de la funció renal, proteïnúria i seguiment). En els panells inferiors es representen els nivells de PAI-1 en plasma (C) i en orina (D) en relació als diferents diagnòstics obtinguts de l'anàlisi histològic de l'empelt renal. Els valors s'expressen com a mitjana \pm SEM.

Taula 38. Estadística descriptiva i inferencial dels nivells de PAI-1 en sang atenent a la indicació a la indicació de la biòpsia (deteriorament agut de la funció renal, proteïnúria o deteriorament crònic de la funció renal i seguiment als 3 mesos) i segons el diagnòstic histopatològic de Banff (Normal, FIAT, Rebuig o altres). A la part superior de la taula s'hi reflecteixen el valor mínim i màxim, la mitjana, la variància, la desviació típica i l'error estàndard de cada grup. A la part inferior es troben detallats els estadístics utilitzats per a dades no paramètriques: el contrast de Kruskal-Wallis i les comparacions múltiples de Dunn (s: significatiu, ns: no significatiu).

PAI-1 en SANG (ng/ml)							
	Segons Indicació de la biòpsia			Segons diagnòstic histopatològic de Banff			
	Deterior Agut (Grup-1)	Proteïnúria (Grup 2)	Seguiment (Grup 3)	Normal (Grup 1)	FIAT (Grup 2)	Rebuig (Grup 3)	Altres (Grup 4)
N	12	11	19	8	18	14	2
Mínim	0.544	0.874	0.88	0.88	0.544	0.95	0.874
Màxim	3.018	2.694	3.226	2.594	3.018	3.226	1.914
Mitjana	1.236	1.422	1.779	1.476	1.405	1.848	1.394
Variància	0.598	0.334	0.469	0.383	0.546	0.520	0.541
Desviació típica (SD)	0.773	0.577	0.684	0.618	0.739	0.721	0.735
Error Estàndard (SEM)	0.258	0.204	0.161	0.234	0.191	0.217	0.52
Contrast de Kruskal-Wallis							
Mediana	1.018	1.302	1.567	1.180	1.198	1.634	1.394
Rang mig	12.0	16.833	21.833	17.143	15.133	22.909	15.5
Estadístic Kruskal-Wallis	5.873			3.866			
Nivell de significança (α)	0.05			0.05			
Valor P	0.053, no significatiu (Tendència)			0.276, no significatiu			
Comparació múltiple de rangs de Dunn							
Grup 1 vs Grup 2	Diferència de rangs= - 4.125		p>0.05, ns	Diferència de rangs= 2.010		p>0.05, ns	
Grup 1 vs Grup 3	Diferència de rangs= - 9.833		p<0.05, s	Diferència de rangs= - 5.766		p>0.05, ns	
Grup 1 vs Grup 4	--		--	Diferència de rangs= 1.643		p>0.05, ns	
Grup 2 vs Grup 3	Diferència de rangs= - 5.708		p>0.05, ns	Diferència de rangs= - 7.776		p>0.05, ns	
Grup 2 vs Grup 4	--		--	Diferència de rangs= - 0.3667		p>0.05, ns	
Grup 3 vs Grup 4	--		--	Diferència de rangs= 7.409		p>0.05, ns	

Taula 39. Estadística descriptiva i inferencial dels nivells de PAI-1 en orina atenent a la indicació a la indicació de la biòpsia (deteriorament agut de la funció renal, proteïnúria o deteriorament crònic de la funció renal i seguiment als 3 mesos) i segons el diagnòstic histopatològic de Banff (Normal, FIAT, Rebuig o altres). A la part superior de la taula s’hi reflecteixen el valor mínim i màxim, la mitjana, la variància, la desviació típica i l’error estàndard de cada grup. A la part inferior es troben detallats els estadístics utilitzats per a dades no paramètriques: el contrast de Kruskal-Wallis i les comparacions múltiples de Dunn (s: significatiu, ns: no significatiu). Per tal de poder realitzar els tests estadístics els valors inferiors al límit de detecció de l’assaig (PAI-1 < 0.0625 ng/ml) s’han expressat com 0.

	PAI-1 en ORINA (µg/ g creatinina)						
	Segons Indicació de la biòpsia			Segons diagnòstic histopatològic (Banff)			
	<i>Deterior Agut (Grup-1)</i>	<i>Proteïnúria (Grup 2)</i>	<i>Seguiment (Grup 3)</i>	<i>Normal (Grup 1)</i>	<i>FIAT (Grup 2)</i>	<i>Rebuig (Grup 3)</i>	<i>Altres (Grup 4)</i>
N	12	11	19	8	18	14	2
Mínim	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Màxim	0.169	0.834	0.573	0.169	0.573	0.834	0.098
Mitjana	0.026	1.123	1.064	0.03	0.044	0.126	0.049
Variància	0.002	0.066	0.023	0.003	0.018	0.058	0.005
Desviació típica (SD)	0.048	0.258	0.152	0.058	0.133	0.242	0.069
Error Estàndard (SEM)	0.014	0.077	0.035	0.021	0.031	0.065	0.049
Contrast de Kruskal-Wallis							
Mediana	0.0	0.017	0.0	0.0	0.0	0.0	0.049
Rang mig	21.25	24.09	20.16	20.62	20.5	22.86	24.5
Estadístic Kruskal-Wallis	0.916			0.572			
Nivell de significança (α)	0.05			0.05			
Valor P	0.632, no significatiu			0.903, no significatiu			
Comparació múltiple de rangs de Dunn							
Grup 1 vs Grup 2	Diferència de rangs= - 2.841		p>0.05, ns	Diferència de rangs= 0.125		p>0.05, ns	
Grup 1 vs Grup 3	Diferència de rangs= 1.092		p>0.05, ns	Diferència de rangs= - 2.232		p>0.05, ns	
Grup 1 vs Grup 4	--		--	Diferència de rangs= - 3.875		p>0.05, ns	
Grup 2 vs Grup 3	Diferència de rangs= 3.933		p>0.05, ns	Diferència de rangs= - 2.357		p>0.05, ns	
Grup 2 vs Grup 4	--		--	Diferència de rangs= - 4.000		p>0.05, ns	
Grup 3 vs Grup 4	--		--	Diferència de rangs= - 1.643		p>0.05, ns	

5.4.2. Relació dels nivells de Fascina-1 en sang i en orina amb la indicació de la biòpsia i el diagnòstic histopatològic

Per tal de determinar si existia una relació entre Fascina-1 i la histopatologia de l'empelt renal es van analitzar els nivells sanguinis i urinaris d'aquesta proteïna en funció de la indicació de la biòpsia i del diagnòstic histopatològic obtingut segons els criteris de Banff. Els resultats d'aquests anàlisis es troben detallats a les Taules 40 i 41.

Ni els nivells sanguinis de Fascina-1 ni els urinaris es van trobar relacionats amb la indicació de la biòpsia o el diagnòstic histopatològic (Figura 34). Per tant, la presència de Fascina-1, en sang o en orina, no es pot associar a cap lesió histològica recollida en la classificació de Banff.

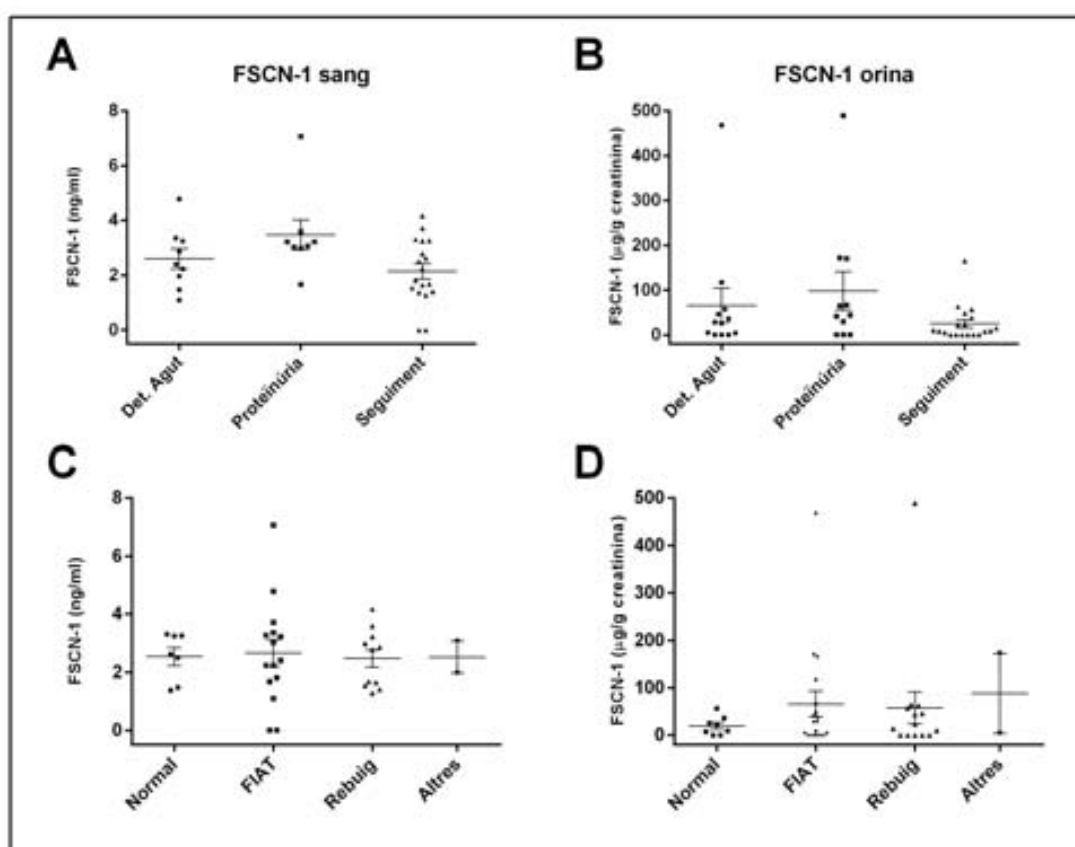


Figura 34. la presència de Fascina-1, en sang o en orina, no es pot associar ni a la indicació de la biòpsia ni a cap lesió histològica recollida en la classificació de Banff. Els gràfics superiors mostren els nivells de FSCN-1 en sang (A) i en orina (B) en els diferents grups de pacients trasplantats de ronyó en funció de la indicació de la biòpsia (deteriorament agut de la funció renal, proteinúria i seguiment). En els panells inferiors es representen els nivells de FSCN-1 en sang (C) i en orina (D) en relació als diferents diagnòstics obtinguts de l'anàlisi histològic de l'empelt renal. Els valors s'expressen com a mitjana ± SEM.

Taula 40. Estadística descriptiva dels nivells de Fascina-1 en sang atenent a la indicació a la indicació de la biòpsia (deteriorament agut de la funció renal, proteïnúria o deteriorament crònic de la funció renal i seguiment als 3 mesos) i segons el diagnòstic histopatològic de Banff (Normal, FIAT, Rebuig o altres). A la part superior de la taula s'hi reflecteixen el valor mínim i màxim, la mitjana, la variància, la desviació típica i l'error estàndard de cada grup. A la part inferior es troben detallats els estadístics utilitzats per a dades no paramètriques: el contrast de Kruskal-Wallis i les comparacions múltiples de Dunn (s: significatiu, ns: no significatiu).

Fascina-1 en SANG (ng/ml)							
	Segons Indicació de la biòpsia			Segons diagnòstic histopatològic de Banff			
	Deterior Agut (Grup-1)	Proteïnúria (Grup 2)	Seguiment (Grup 3)	Normal (Grup 1)	FIAT (Grup 2)	Rebuig (Grup 3)	Altres (Grup 4)
N	12	11	19	8	18	14	2
Mínim	1.1	1.67	0.0	1.37	0.0	1.28	1.97
Màxim	4.79	7.07	4.17	3.31	7.07	4.17	3.07
Mitjana	2.4	3.145	2.025	2.54	2.661	2.469	2.52
Variància	1.246	2.417	1.368	0.689	3.223	0.997	0.605
Desviació típica (SD)	1.116	1.555	1.169	0.830	1.795	0.998	0.778
Error Estàndard (SEM)	0.372	0.550	0.276	0.314	0.463	0.301	0.55
Contrast de Kruskal-Wallis							
Mediana	1.246	2.417	1.368	2.62	2.4	2.78	2.52
Rang mig	18.111	23.875	15.333	18.428	18.633	16.864	18.0
Estadístic Kruskal-Wallis	3.851			0.205			
Nivell de significança (α)	0.05			0.05			
Valor P	0.156, no significatiu			0.977, no significatiu			
Comparació múltiple de rangs de Dunn							
Grup 1 vs Grup 2	Diferència de rangs= 5.764		p>0.05, ns	Diferència de rangs= - 0.205		p>0.05, ns	
Grup 1 vs Grup 3	Diferència de rangs= - 2.778		p>0.05, ns	Diferència de rangs= - 1.564		p>0.05, ns	
Grup 1 vs Grup 4	--		--	Diferència de rangs= - 0.428		p>0.05, ns	
Grup 2 vs Grup 3	Diferència de rangs= - 8.542		p>0.05, ns	Diferència de rangs= 1.769		p>0.05, ns	
Grup 2 vs Grup 4	--		--	Diferència de rangs= 0.633		p>0.05, ns	
Grup 3 vs Grup 4	--		--	Diferència de rangs= -1.136		p>0.05, ns	

Taula 41. Estadística descriptiva dels nivells de Fascina-1 en orina atenent a la indicació a la indicació de la biòpsia (deteriorament agut de la funció renal, proteïnúria o deteriorament crònic de la funció renal i seguiment als 3 mesos) i segons el diagnòstic histopatològic de Banff (Normal, FIAT, Rebuig o altres). A la part superior de la taula s'hi reflecteixen el valor mínim i màxim, la mitjana, la variància, la desviació típica i l'error estàndard de cada grup. A la part inferior es troben detallats els estadístics utilitzats per a dades no paramètriques: el contrast de Kruskal-Wallis i les comparacions múltiples de Dunn (s: significatiu, ns: no significatiu). Per tal de poder realitzar els tests estadístics els valors inferiors al límit de detecció de l'assaig (FSCN-1 < 0.78 ng/ml) s'han expressat com 0.

	Fascina-1 en ORINA ($\mu\text{g/g}$ creatinina)						
	Segons Indicació de la biòpsia			Segons diagnòstic histopatològic (Banff)			
	Deterior Agut (Grup-1)	Proteïnúria (Grup 2)	Seguiment (Grup 3)	Normal (Grup 1)	FIAT (Grup 2)	Rebuig (Grup 3)	Altres (Grup 4)
N	12	11	19	8	18	14	2
Mínim	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4.0
Màxim	468.24	489.41	165.14	56.667	448.24	489.41	172.31
Mitjana	65.683	97.888	24.730	19.726	66.114	57.906	88.155
Variància	17223.5	20577.4	1560.37	388.016	13067.6	16062.1	14164.1
Desviació típica (SD)	131.238	143.448	39.5015	19.698	114.314	126.736	119.013
Error Estàndard (SEM)	37.885	43.251	9.062	6.964	26.944	33.872	84.155
Contrast de Kruskal-Wallis							
Mediana	27.065	43.7	9.25	15.8	28.735	18.425	88.155
Rang mig	21.458	27.0	18.342	19.062	22.556	20.821	26.5
Estadístic Kruskal-Wallis	3.517			0.835			
Nivell de significança (α)	0.05			0.05			
Valor P	0.172, no significatiu			0.841, no significatiu			
Comparació múltiple de rangs de Dunn							
Grup 1 vs Grup 2	Diferència de rangs= - 5.542		$p>0.05$, ns	Diferència de rangs= -3.494		$p>0.05$, ns	
Grup 1 vs Grup 3	Diferència de rangs= 3.116		$p>0.05$, ns	Diferència de rangs= - 1.759		$p>0.05$, ns	
Grup 1 vs Grup 4	--		--	Diferència de rangs= -7.438		$p>0.05$, ns	
Grup 2 vs Grup 3	Diferència de rangs= 8.658		$p>0.05$, ns	Diferència de rangs= 1.735		$p>0.05$, ns	
Grup 2 vs Grup 4	--		--	Diferència de rangs= -3.944		$p>0.05$, ns	
Grup 3 vs Grup 4	--		--	Diferència de rangs= - 5.679		$p>0.05$, ns	

5.5. ANÀLISI DE PAI-1 I FASCINA-1 RESPECTE ELS SIGNES HISTOLÒGICS DE NEFROTOXICITAT PER CNIS: VACUOLITZACIÓ ISOMÈTRICA I HIALINOSI ARTERIOLAR

Per a determinar si la presència de PAI-1 o de Fascina-1, tant en sang com en orina, es podia associar a nefrotoxicitat per CsA o FK-506 es van analitzar els nivells d'ambdues proteïnes en funció dels signes histopatològics més característics d'aquest tipus de dany: la vacuolització isomètrica de les cèl·lules tubulars i la hialinòsi arteriolar. Aquest anàlisi, a més de dilucidar si l'aparició d'aquestes proteïnes es pot relacionar amb nefrotoxicitat per CNIs, hauria de permetre conèixer si s'associen a lesions renals agudes (presència de signes de vacuolització isomètrica) i/o cròniques (presència d'hialinòsi arteriolar) causades per CNIs.

Les mostres de sang i orina que es van obtenir no eren homogènies en quant al temps transcorregut des del trasplantament (veure Taula 10 de Materials, Mètodes i Pacients). Amb l'objectiu de minimitzar la variabilitat associada al temps post-trasplantament de cada un dels pacients es van analitzar només les dades d'aquells pacients amb menys d'un any de trasplantament. Alhora, això va permetre analitzar més específicament els efectes de la nefrotoxicitat per CNIs ja que és durant el període post-trasplant més immediat on s'espera poder distingir millor els signes de dany renal per CNIs d'altres lesions. L'estadístic utilitzat per analitzar aquests paràmetres va ser un test "t" per a dades desaparellades amb la correcció de Welch. Aquesta correcció permet utilitzar el test "t" en dades on s'obté normalitat de residus però no igualtat de variàncies.

5.5.1. Anàlisi dels nivells de PAI-1 en sang i en orina respecte els signes de nefrotoxicitat per CNIs

Com s'ha suggerit en els apartats anteriors, la presència de PAI-1 en orina podria ser conseqüència de la pèrdua de proteïnes plasmàtiques a la orina ja que els nivells en plasma són molt superiors als d'orina en tots els grups de pacients (Figura 23) i els nivells de PAI-1 urinaris correlacionen fortament amb la proteïnúria (Taula 34). Curiosament, nivells més elevats de PAI-1 en sang podrien indicar millor funció renal, ja que correlacionen de forma inversa amb els nivells de creatinina sèrica (Taula 33). En aquest sentit, vam poder constatar que el grup que presentava nivells

més elevats d'aquesta proteïna en sang eren els pacients trasplantats de ronyó amb millor funció renal, els que se'ls indica la biòpsia per seguiment als 3 mesos post-trasplantament (Figura 33, A).

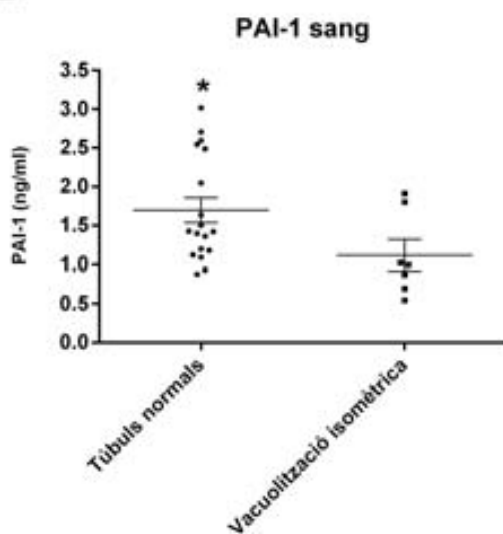
En conjunt, els resultats presentats en apartats anteriors, no induïen a pensar que els nivells de PAI-1 en sang o orina poguessin indicar dany renal per fàrmacs CNIs. Tot i això, es van avaluar els nivells de PAI-1 (tant en sang com en orina) en funció de la vacuolització isomètrica de les cèl·lules tubulars i la hialinosi arteriolar.

No es van observar canvis significatius en els nivells de PAI-1 en orina considerant la presència de vacuolització isomètrica (Figura 35, A i C). En canvi en plasma, els nivells de PAI-1 eren significativament més elevats en els pacients sense vacuolització isomètrica (Figura 35, A i B). Aquest fet, reforça la idea de que pacients trasplantats de ronyó amb nivells alts de PAI-1 en sang tindrien millor funció renal (Taula 33 i Figura 33, A).

A

	Vacuolització isomètrica			
	PAI-1 en sang (ng/ml)		PAI-1 en orina (µg/ g creatinina)	
	Sense signes de Vacuolització Isomètrica	Vacuolització isomètrica (I, II o III)	Sense signes de Vacuolització Isomètrica	Vacuolització isomètrica (I, II o III)
N	19	9	19	9
Mínim	0.880	0.544	0.0	0.0
Màxim	3.018	1.908	0.573	0.157
Mediana	1.422	0.992	0.0	0.031
Mitjana	1.696	1.119	0.065	0.045
Variància	0.378	0.320	0.023	0.003
Desviació típica (SD)	0.682	0.530	0.148	0.056
Error Estàndard (SEM)	0.1607	0.200	0.033	0.020
Test T per a dades desparellades amb correcció de Welch				
Estadístic "t"	2.250		0.541	
Nivell de significança (α)	0.05		0.05	
Valor P (1 cua)	0.0205, significatiu		0.296, no significatiu	

B



C

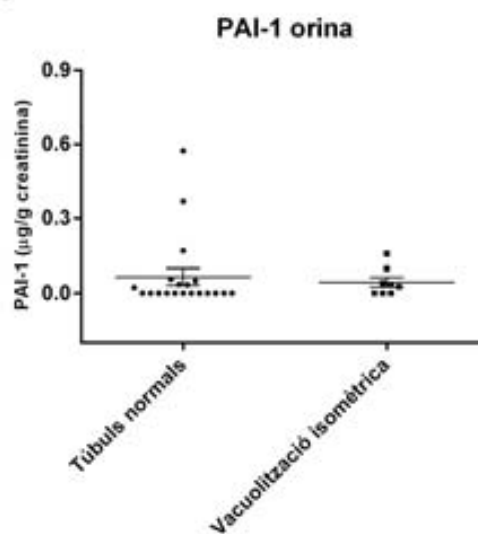


Figura 35. Els nivells de PAI-1 sanguinis són més elevats en pacients que no presenten vacuolització isomètrica. A la taula superior (A), es mostra la estadística descriptiva (valor mínim i màxim, la mitjana, la mediana, la variància, la desviació típica i l'error estàndard de cada grup) i inferencial (Test "t" amb correcció de Welch) dels nivells de PAI-1 en sang i en orina en funció a la presència o absència de vacuolització isomètrica. Als gràfics B (PAI-1 en sang) i C (PAI-1 en orina) s'hi troben representades les dades de la taula. Els valors s'expressen com a mitjana ± SEM (*, p<0.05).

Pel que fa a la hialinosi arteriolar, a la Figura 36 es pot observar que, tant pel que fa als nivells de PAI-1 en sang com en orina, no es van observar diferències significatives entre els pacients sense signes de hialinosi arteriolar i els que sí que en presentaven.

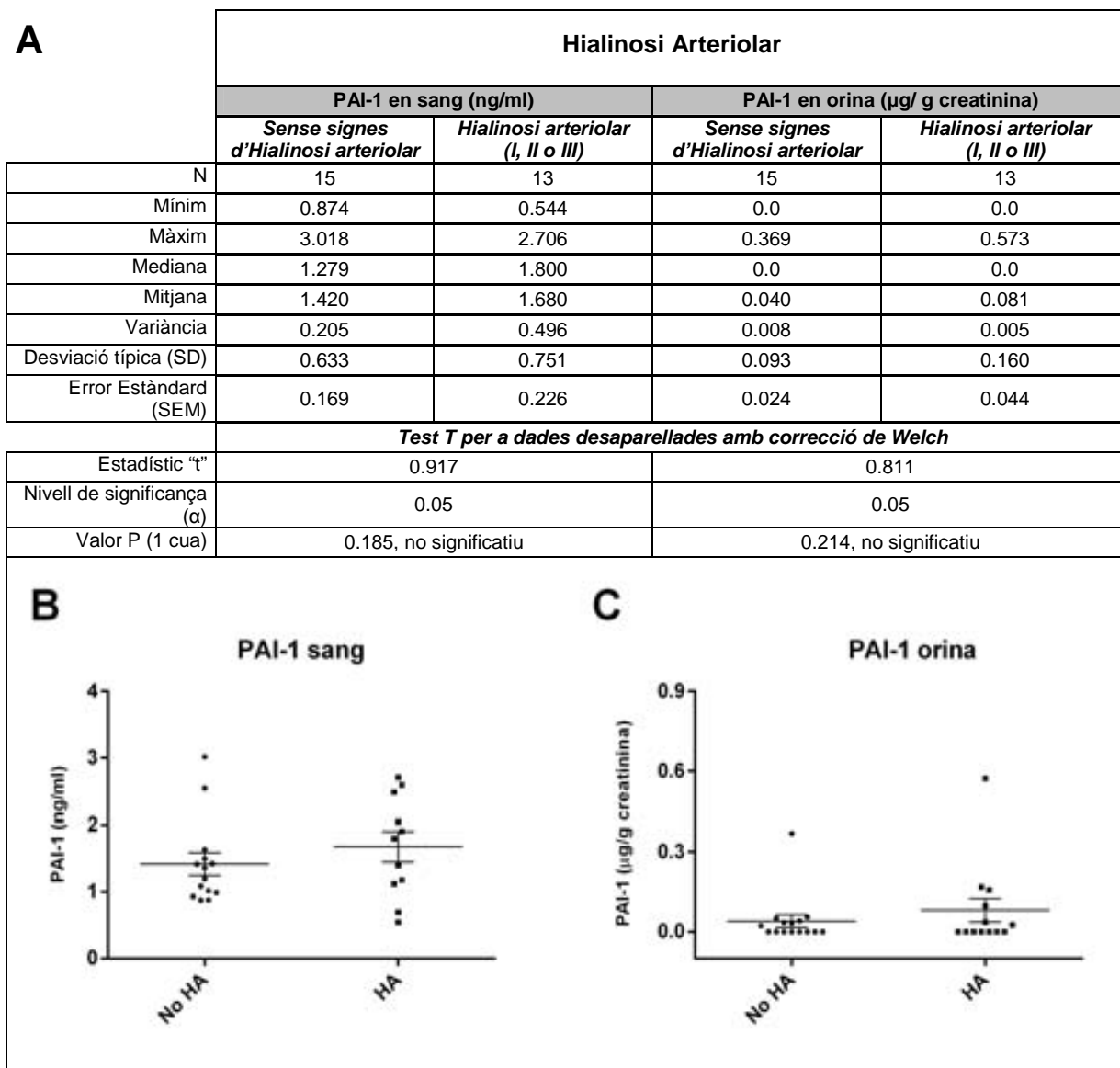


Figura 36. Nivells de PAI-1 en sang i en orina en funció dels signes de hialinosi arteriolar (HA). A la taula superior (A), es mostra la estadística descriptiva (valor mínim i màxim, la mitjana, la mediana, la variància, la desviació típica i l'error estàndard de cada grup) i inferencial (Test "t" amb correcció de Welch) dels nivells de PAI-1 en sang i en orina en funció a la presència o absència de hialinosi arteriolar. Als gràfics B (PAI-1 en sang) i C (PAI-1 en orina) s'hi troben representades les dades de la taula. Els valors s'expressen com a mitjana ± SEM.

Els resultats obtinguts en aquest apartat confirmen que ni els nivells de PAI-1 en sang ni en orina es poden relacionar amb els signes histològics de nefrotoxicitat per CNIs. És a dir, la mesura dels nivells de PAI-1 en sang o en orina no resultaria útil per detectar dany renal per fàrmacs anticalcineurínics.

5.5.2. Anàlisi dels nivells de Fascina-1 en sang i en orina respecte els signes de nefrotoxicitat per CNIs

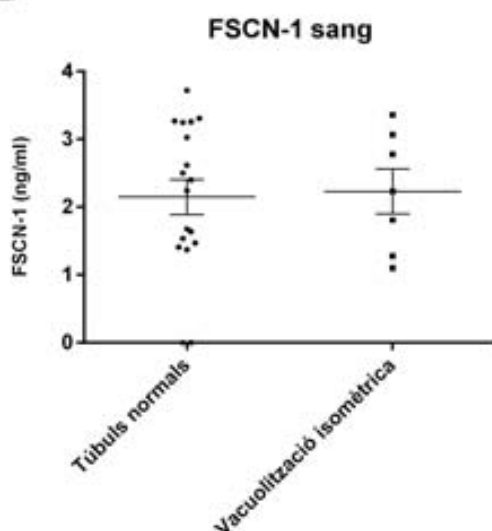
Els resultats presentats anteriorment mostraven que ni els nivells de Fascina-1 en sang ni en orina, correlacionaven amb marcadors de funció renal coneguts (Taules 35, 36 i 37). Tampoc, es va poder relacionar la presència de Fascina-1 en sang o orina amb lesions histològiques classificades segons els criteris de Banff (Figura 34). En aquest apartat, s'ha avaluat el significat de la presència Fascina-1, tant en sang com en orina, en funció dels signes de nefrotoxicitat per CNIs: vacuolització isomètrica i hialinosi arteriolar.

Quan es van comparar els nivells sanguinis de Fascina-1 en pacients amb i sense signes de vacuolització isomètrica tampoc es van observar diferències significatives (Figura 37, A i B). En canvi, es van observar nivells de Fascina-1 en orina més elevats ($p = 0.069$) en presència de vacuolització isomètrica (Figura 37, A i C). Aquests resultats, suggereixen que Fascina-1 podria aparèixer en orina degut a processos de dany tubular agut causat per fàrmacs CNIs.

A

	Vacuolització isomètrica			
	Fascina-1 en sang (ng/ml)		Fascina-1 en orina (µg/ g creatinina)	
	Sense signes de Vacuolització Isomètrica	Vacuolització isomètrica (I, II o III)	Sense signes de Vacuolització Isomètrica	Vacuolització isomètrica (I, II o III)
N	19	9	19	9
Mínim	0.0	1.1	0.0	0.0
Màxim	3.72	3.36	62.52	468.24
Mediana	2.24	2.1	22.35	14.24
Mitjana	2.136	2.2	23.229	104.563
Variància	1.272	0.672	493.351	23968.7
Desviació típica (SD)	1.128	0.819	22.211	154.818
Error Estàndard (SEM)	0.273	0.290	5.096	51.606
Test T per a dades desaparellades amb correcció de Welch				
Estadístic T	0.1955		1.665	
Nivell de significança (α)	0.05		0.05	
Valor P (1 cua)	0.4239, no significatiu		0.0696, no significatiu (Tendència)	

B



C

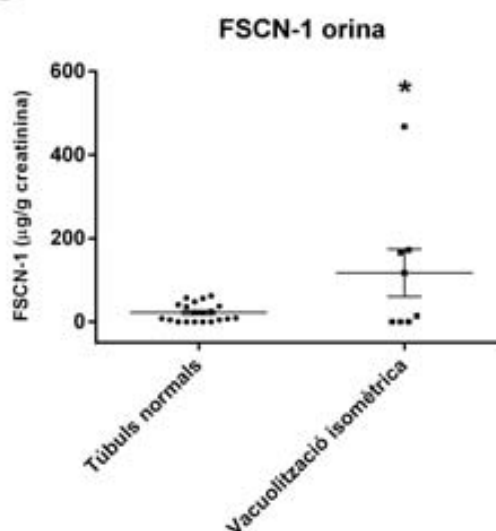


Figura 37. Els nivells de Fascina-1 en orina són més elevats en pacients amb signes de vacuolització isomètrica. A la taula superior (A), es mostra la estadística descriptiva (valor mínim i màxim, la mitjana, la mediana, la variància, la desviació típica i l'error estàndard de cada grup) i inferencial (Test “t” amb correcció de Welch) dels nivells de Fascina-1 en sang i en orina en funció a la presència o absència de vacuolització isomètrica. Als gràfics B (Fascina-1 en sang) i C (Fascina-1 en orina) s’hi troben representades les dades de la taula. Els valors s’expressen com a mitjana ± SEM (*, p<0.1).

Respecte a la presència de hialinosi arteriolar, no existeixen diferències significatives en els nivells de Fascina-1, tant en sang com en orina, entre els pacients trasplantats de ronyó sense i amb signes d'hialinosi arteriolar (Figura 38).

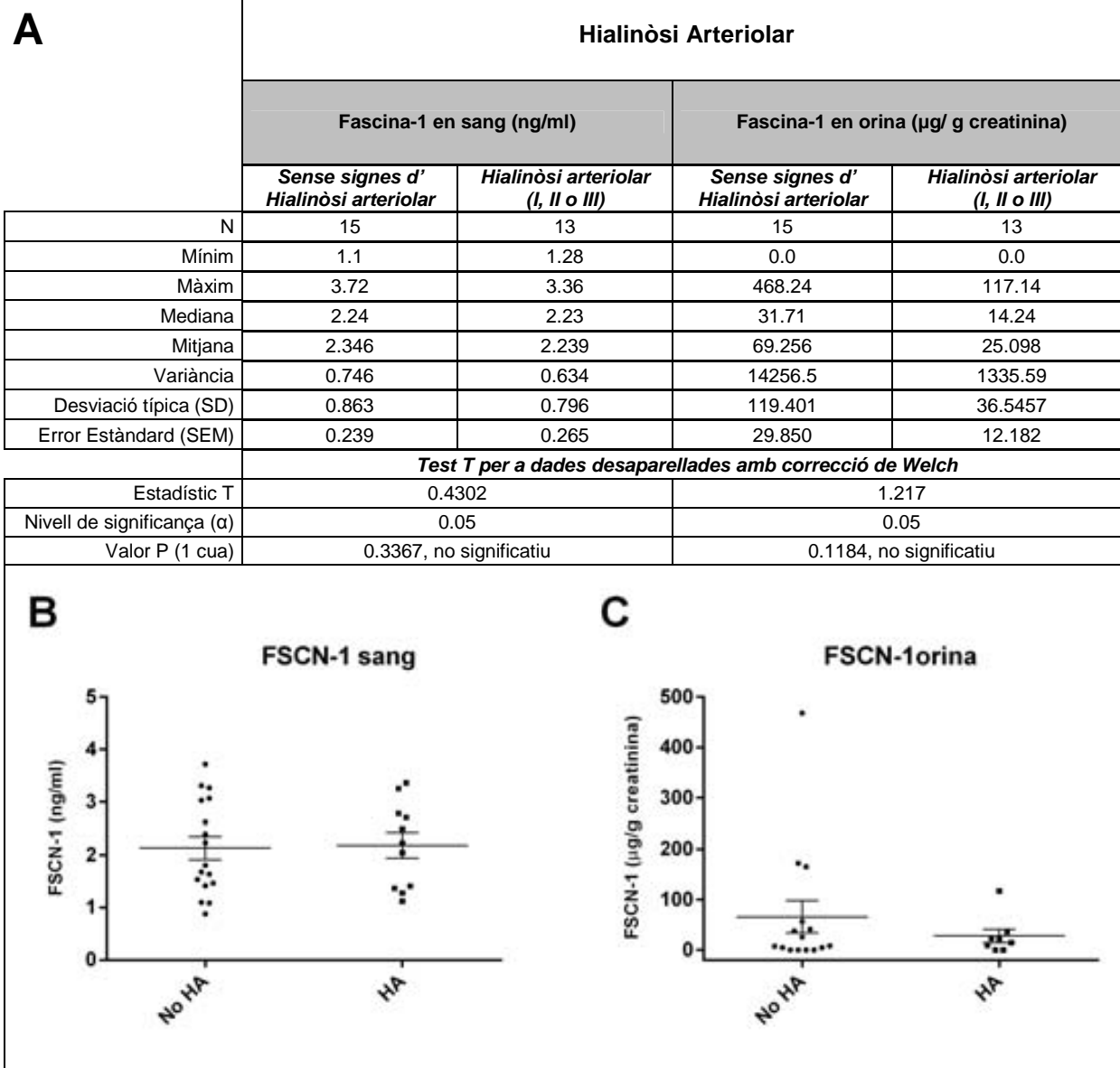


Figura 38. Nivells de Fascina-1 en sang i en orina en funció dels signes de hialinosi arteriolar (HA). A la taula superior (A), es mostra la estadística descriptiva (valor mínim i màxim, la mitjana, la mediana, la variància, la desviació típica i l'error estàndard de cada grup) i inferencial (Test "t" amb correcció de Welch) dels nivells de Fascina-1 en sang i en orina en funció a la presència o absència de hialinosi arteriolar. Als gràfics B (Fascina-1 en sang) i C (Fascina-1 en orina) s'hi troben representades les dades de la taula. Els valors s'expressen com a mitjana ± SEM.

Els resultats detallats en aquest apartat suggereixen que la mesura dels nivells de Fascina-1 en orina podria ser útil per detectar dany tubular agut causat per CNIs ja que els pacients trasplantats de ronyó amb signes de vacuolització isomètrica tenen nivells més alts d'aquesta proteïna a la orina.

5.6. ANÀLISI DE PAI-1 I FASCINA-1 RESPECTE ALS NIVELLS SISTÈMICS DE FK-506

L'efecte nefrotòxic dels fàrmacs anticalcineurínics correlaciona amb els nivells sistèmics d'aquests, és a dir, a major concentració de CsA o FK-506 en sang major és la nefrotoxicitat produïda per aquests. Per tal de comprovar si els nivells de PAI-1 o de Fascina-1 en sang o orina correlacionaven amb els nivells plasmàtics de CNIs, es van obtenir les dades de concentració sanguínia de dits fàrmacs en el moment de la recollida de les mostres. Per a realitzar el model de correlació es van considerar aquells pacients amb menys d'un any de trasplantament per a reduir la variabilitat associada al temps post-trasplantament pel que fa a la concentració sanguínia de fàrmacs CNIs. Tant sols es van incloure aquells pacients que prenen FK-506 ja que tant sols 4 dels pacients trasplantats de ronyó estaven immunosuprimits amb CsA (Taula 10 de Materials, Mètodes i Pacients).

Per relacionar els nivells de PAI-1 o Fascina-1 sanguinis o urinaris amb la concentració en sang de FK-506 es va realitzar un test de regressió lineal simple.

5.6.1. Correlació entre els nivells de PAI-1 en sang i en orina i els nivells sistèmics de FK-506

Com reflecteixen les dades de la Taula 42, tant els nivells de PAI-1 en sang com de PAI-1 en orina correlacionaven pobrament amb els nivells de FK-506, ja que els coeficients de correlació (0.285 i - 0.076, respectivament) es van trobar molt per sota de 1. En cap dels dos casos, utilitzant els models de regressió lineal proposats, l'anàlisi de la variància va mostrar correlació significativa. Per tant, ni la concentració de PAI-1 en sang ni en orina es poden explicar per efecte dels nivells sistèmics de FK-506.

Taula 42. **Model de correlació entre els nivells de PAI-1 en sang (esquerra) o en orina (dreta) amb els nivells sistèmics de FK-506.** A la part superior de la taula s'hi mostra l'equació del model lineal proposat i els paràmetres associats. El coeficient de correlació indica el grau de correlació existent entre les dos variables, com més proper a 1 més forta és la relació entre variables. R^2 i R^2 ajustat pels graus de llibertat indiquen quin percentatge de la variabilitat explica el model. Mitjançant l'estadístic de Durbin-Watson s'examinen els residus per tal de determinar si l'ordre en que s'han introduït les dades afecta de forma significativa el model proposat ($\alpha=0.05$). A la part inferior, s'hi mostra l'anàlisi de la variància. *sPAI-1: nivells en sang de PAI-1, uPAI-1: nivells en orina de PAI-1.*

	Correlació PAI-1 sang (ng/ml) vs nivells FK-506 (ng/ml)			Correlació PAI-1 orina ($\mu\text{g/g}$ creatinina) vs nivells FK-506 (ng/ml)		
<i>Anàlisi de regressió lineal simple</i>						
Paràmetre	Estimació	Estadístic T	Valor P	Estimació	Estadístic T	Valor P
Ordenada	0.817	1.629	0.118	0.103	0.963	0.345
Pendent	0.067	0.049	0.187	-0.004	-0.375	0.711
<i>Model de regressió lineal simple</i>						
Equació del model lineal	sPAI-1=0.817 + 0.066*FK-506			uPAI-1=0.103 – 0.004*FK-506		
Coeficient de correlació	0.285			-0.076		
R^2 (%)	8.141			0.581		
R^2 ajustat pels graus de llibertat (%)	3.766			-3.561		
Estadístic de Durbin-Watson (p)	0.495			0.478		
<i>Anàlisi de la variància</i>						
Freqüència	25			25		
Coeficient F	1.86			0.14		
Nivell de significança (α)	0.05			0.05		
Valor P	0.1869, no significatiu			0.711, no significatiu		

5.6.2. Correlació entre els nivells de Fascina-1 en sang i en orina i els nivells sistèmics de FK-506

Les dades recollides a la Taula 43 mostren que els nivells sanguinis de Fascina-1 correlacionaven pobrament amb els nivells sistèmics de FK-506 (coeficient de correlació = -0.163) i de forma no significativa ($p > 0.05$). En canvi, els nivells de Fascina-1 en orina correlacionaven ($p=0.07 < 0.1$) de manera mitjanament significativa amb els nivells en sang de FK-506 tot i que de forma dèbil (coeficient de correlació = 0.36). Probablement no es va obtenir una millor correlació pel fet de no comptar amb pacients amb nivells extrems (baixos o alts) de FK-506 en sang ja que la concentració d'aquest fàrmac s'intenta mantenir en un marge estret. Tot i això, aquests resultats reforcen la idea que els nivells de Fascina-1 en orina es relacionen amb la nefrotoxicitat per fàrmacs anticalcineurínics.

Taula 43. **Model de correlació entre els nivells de Fascina-1 en sang (esquerra) o en orina (dreta) amb els nivells sistèmics de FK-506.** A la part superior de la taula s'hi mostra l'equació del model lineal proposat i els paràmetres associats. El coeficient de correlació indica el grau de correlació existent entre les dos variables, com més proper a 1 més forta és la relació entre variables. R^2 i R^2 ajustat pels graus de llibertat indiquen quin percentatge de la variabilitat explica el model. Mitjançant l'estadístic de Durbin-Watson s'examinen els residus per tal de determinar si l'ordre en que s'han introduït les dades afecta de forma significativa el model proposat ($\alpha=0.05$). A la part inferior, s'hi mostra l'anàlisi de la variància. *sFSCN-1: nivells en sang de Fascina-1, uFSCN-1: nivells en orina de Fascina-1.*

	Correlació Fascina-1 sang (ng/ml) vs nivells FK-506 (ng/ml)			Correlació Fascina-1 orina ($\mu\text{g/g}$ creatinina) vs nivells FK-506 (ng/ml)		
Anàlisi de regressió lineal simple						
Paràmetre	Estimació	Estadístic T	Valor P	Estimació	Estadístic T	Valor P
Ordenada	2.731	3.250	0.004	-84.977	-1.144	0.264
Pendent	-0.062	-0.758	0.457	13.733	1.896	0.07
Model de regressió lineal simple						
Equació del model lineal	sFSCN-1 = 2.73 – 0.06 * FK-506			uFSCN-1 = -84.98 + 13.73 * FK-506		
Coeficient de correlació	-0.163			0.361		
R^2 (%)	2.665			13.023		
R^2 ajustat pels graus de llibertat (%)	-1.970			9.398		
Estadístic de Durbin-Watson (ρ)	1.535 ($\rho=0.134$)			1.988 ($\rho=0.401$)		
Anàlisi de la variància						
Freqüència	25			25		
Coeficient F	0.57			3.59		
Nivell de significança (α)	0.05			0.05		
Valor P	0.457, no significatiu			0.0701, no significatiu (Tendència)		

6. DETECCIÓ DE FASCINA-1 EN ORINA DE PACIENTS TRASPLANTATS DE PULMÓ

Els resultats obtinguts en pacients trasplantats de ronyó suggerien que nivells elevats de Fascina-1 en orina podrien indicar dany renal produït per fàrmacs anticalcineurínics. Però, com s'ha esmentat, els processos de nefrotoxicitat per CsA o FK-506 en pacients trasplantats de ronyó es poden confondre fàcilment amb d'altres tipus de dany. Per tal d'assegurar que nivells més alts de Fascina-1 en orina serien conseqüència del dany renal per CNIs, es van analitzar els nivells de Fascina-1 en orina i sang de pacients trasplantats de pulmó. Aquests pacients tant sols estan sotmesos de forma permanent a una noxa que pugui afectar la funció renal: els fàrmacs anticalcineurínics, CsA o FK-506. És a dir, una pèrdua de funció renal en aquest tipus de pacients es pot atribuir amb alt grau de seguretat a nefrotoxicitat per CNIs.

Es van recollir mostres de 34 pacients trasplantats de pulmó que es van codificar amb la nomenclatura "TP-n^o". Es va obtenir una mostra prèviament al trasplantament i diverses posteriorment per tal d'obtenir mostres seriades. Es van analitzar únicament aquells pacients dels que es disposava de:

- Mostra d'orina i sang prèvia al trasplantament (un dia abans del trasplantament).
- Mostres post-trasplantament de sang i d'orina extretes el mateix dia.
- Mostres seriades com a mínim d'un mes de seguiment post-trasplantament.

Seguint aquests criteris es van analitzar les mostres de sang i orina dels pacients TP-2, TP-5, TP-7, TP-17, TP-18 i TP-30. Les dades demogràfiques dels pacients i les mostres utilitzades es troben detallades a la Taula 15 de Materials, Mètodes i Pacients.

Els nivells de Fascina-1 de les mostres d'orina i sang seleccionades es van mesurar utilitzant el mateix assaig ELISA que en l'apartat anterior (E91757Hu, *USCN Life science inc.*). Per tal de valorar la funció renal en el moment de recollida de cada mostra es va cercar, de forma retrospectiva en els historials mèdics, els nivells de creatinina sèrica. A la Taula 44 s'hi reflecteixen les dades esmentades.

En la majoria de mostres, els nivells en sang de Fascina-1 es troben dins el rang de valors obtinguts en l'apartat anterior (0.078 a 7-8 ng/ml, Figura 24). Només en algunes mostres dels pacients TP-2 i TP-5 es van observar nivells superiors a 10 ng/ml (Taula 44). Donat que no existeixen estudis previs on es mesurin els nivells d'aquesta proteïna en sang, no es pot conèixer si aquests nivells són normals o no.

Taula 44. **Seguiment dels nivells sistèmics de CsA o FK-506, els nivells de creatinina sèrica i dels nivells Fascina-1 urinària i sanguínia.** A la taula s'hi detallen les dades del seguiment dels pacients trasplantats de pulmó inclosos dins l'estudi (TP-2, TP-5, TP-7, TP-17, TP-18 i TP-30). S'han recollit les següents dades clíniques al llarg del temps: els nivells sistèmics de CsA o FK-506 i la funció renal (creatinina sèrica). Fascina-1 s'ha mesurat per assaig ELISA en les mostres d'orina i sang disponibles. En orina, aquelles mostres que van presentar nivells inferiors al límit de detecció de l'assaig (FSCN-1<0.078 ng/ml) s'han expressat com a 0.

Temps post TP (mesos)	TP-2				TP-5			
	CsA (ng/ml)	Creatinina (mg/dl)	FSCN-1 orina (µg/g creatinina)	FSCN-1 sang (ng/ml)	FK-506 (ng/ml)	Creatinina (mg/dl)	FSCN-1 orina (µg/g creatinina)	FSCN-1 sang (ng/ml)
Pre-TP	0	0.8	0	12	0	0.69	10.55	16.3
0.25	--	--	--	--	16.4	1.54	28.18	15.9
1	206	0.96	0	6.33	5.3	1.98	0	4.95
2	--	--	--	--	8.4	0.87	0	10.9
3	415	1.15	0	10.4	8.2	0.85	--	--
4	276	1.1	0	3.18	--	--	--	--
6	271	1.32	--	--	3.2	0.72	--	--
9	196	1.44	--	--	--	--	--	--
12	289	1.66	--	8.1	--	1.4	--	--
24	--	1.47	--	--	--	1.6	--	--
Temps post TP (mesos)	TP-7				TP-17			
	CsA (ng/ml)	Creatinina (mg/dl)	FSCN-1 orina (µg/g creatinina)	FSCN-1 sang (ng/ml)	FK-506 (ng/ml)	Creatinina (mg/dl)	FSCN-1 orina (µg/g creatinina)	FSCN-1 sang (ng/ml)
Pre-TP	0	0.93	1.43	4.26	0	0.89	17.18	1.57

0.25	222	1.64	--	--	--	--	--	--
0.5	227	1.1	0	6.69	--	--	--	--
1	574	0.96	--	--	--	--	--	--
2	421	0.86	0	5.94	15.0	0.7	99.64	2.01
3	272	0.83	--	--	8.1	0.71	81.22	3.44
4	--	--	--	--	14.0	0.71	227.00	<0.078
6	339	0.96	--	--	16.5	1.3	--	--
9	162	0.88	33.88	6.3	--	--	--	--
10	355	1.89	130.6	1.53	--	--	--	--
11	100	2.36	21.56	6.07	--	--	--	--
12		3.2	--	--		2.14	--	--
24		2.4	--	--	--	--	--	--
	TP-18				TP-30			
Temps post TP (mesos)	CsA (ng/ml)	Creatinina (mg/dl)	FSCN-1 orina (µg/g creatinina)	FSCN-1 sang (ng/ml)	CsA (ng/ml)	Creatinina (mg/dl)	FSCN-1 orina (µg/g creatinina)	FSCN-1 sang (ng/ml)
Pre-TP	0	0.78	0	3.99	0	0.7	0	1.06
0.5	214	0.99	--	--	274	0.79	0	3.19
1	197	0.71	0	5.49	205	1.03	0	2.84
3	388	0.94	35	3.13	365	1.04	--	--
5	232	0.76	0.0	2.56	--	--	--	--
6	--	--	--	--	308	1.53	--	--
12	228	1.18	74.73	1.99	173	1.65	--	--

Per poder valorar si els nivells de Fascina-1 urinària realment indicaven disfunció renal causada per fàrmacs CNI, es va valorar de forma qualitativa si els nivells de Fascina-1 en orina incrementaven i si ho feien juntament amb els nivells de creatinina sèrica. A la Figura 39 es mostren els nivells de Fascina-1 de les mostres seriades d'orina i els nivells de creatinina sèrica en cada moment dels diferents pacients.

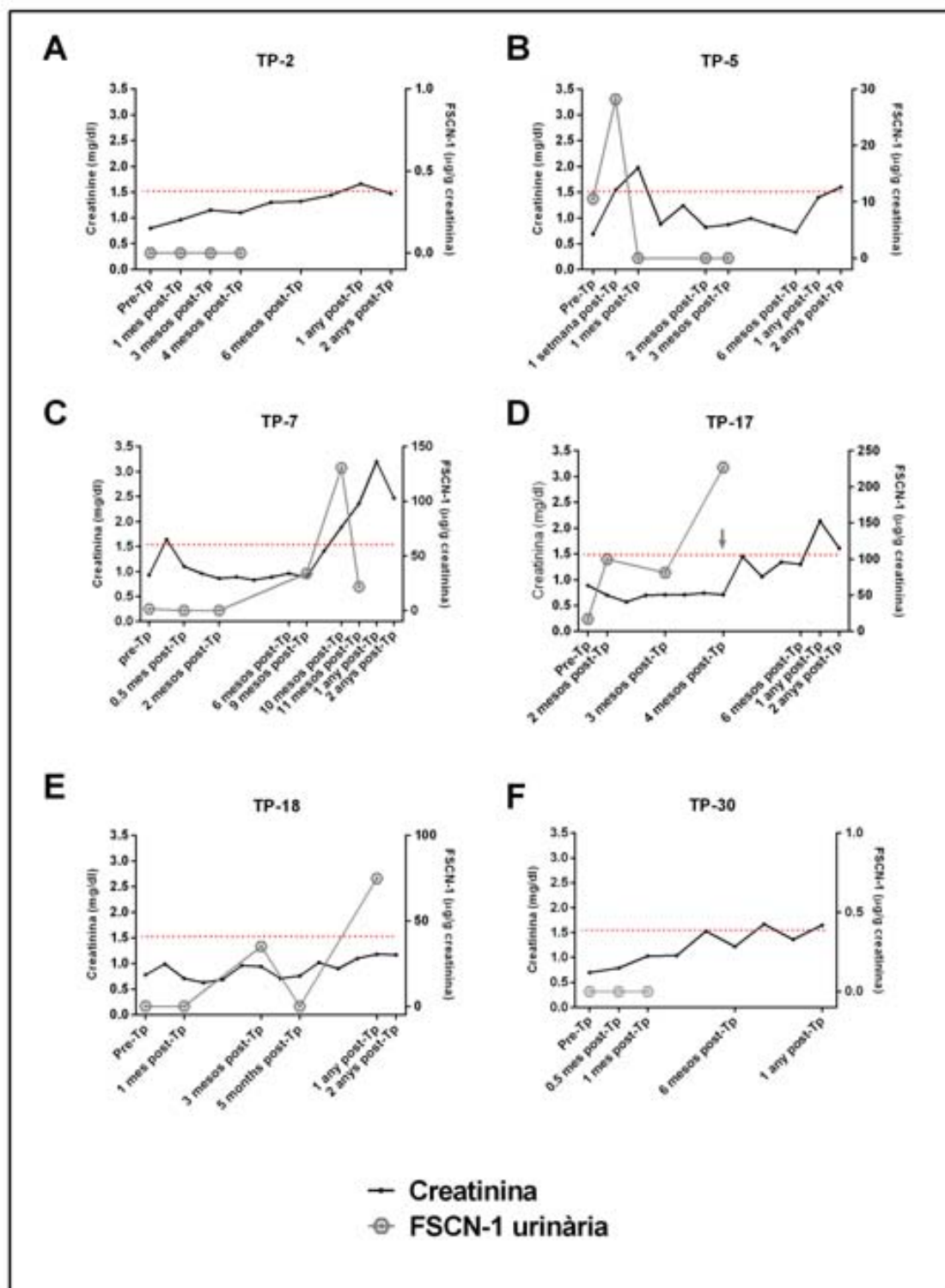


Figura 39. Fascina-1 incrementa en orina de pacients trasplantats prèviament a episodis de disfunció renal. En els gràfics s'hi mostren els nivells de Fascina-1 en orina de les mostres seriades i els nivells de creatinina sèrica al llarg del temps dels pacients TP-2 (A), TP-5 (B), TP-7 (C), TP-17 (D), TP-18 (E) i TP-30 (F). Fascina-1 en orina s'ha mesurat per assaig ELISA. Totes les mostres s'han assajat per duplicat, utilitzant controls interplaca i obtenint sempre coeficients de variació entre duplicats inferiors al 10%. Els pacients TP-5, TP-7 i TP-17 (B, C, D) presenten increments dels nivells de Fascina-1 en orina prèviament a pèrdua de funció renal. S'ha considerat pèrdua de la funció renal nivells de creatinina sèrica superiors a 1.5 mg/dl. *Tp: Trasplantament.

Com es pot apreciar a la Figura 39 totes les mostres d'orina de les que es disposava dels pacients TP-2 i TP-30 tenien nivells de Fascina-1 no detectables. Si considerem disfunció renal valors de creatinina superiors a 1.5 mg/dl (es va assumir que els nivells de creatinina normals són de 0,6 a 1.3 mg/dl), es pot dir que aquests dos pacients no van presentar pèrdua de la funció renal el primer any post-trasplantament (Figura 39, A i F, respectivament).

En les mostres d'orina als quatre mesos i a l'any post-trasplantament del pacient TP-18 els nivells de Fascina-1 van resultar elevats. Tot i això, en aquest pacient, l'increment d'aquesta proteïna en orina no es pot relacionar amb disfunció renal ja que els nivells de creatinina sèrica es van mantenir per sota de 1.5 mg/dl durant els dos primers anys després del trasplantament (Figura 39, E).

En canvi, els pacients TP-5, TP-7 i TP-17 van mostrar un increment dels nivells de Fascina-1 urinària que precedia l'increment en els nivells de creatinina sèrica:

- El pacient TP-5 va patir un episodi de dany renal agut entre la segona setmana i el primer mes post-trasplantament ja que els nivells de creatinina van augmentar de 0.9 a 2 mg/dl normalitzant-se posteriorment. Resulta interessant que només set dies després del trasplantament, i anticipant-se al pic de creatinina sèrica, s'observa un increment dels nivells de Fascina-1 en orina (Figura 39, B).
- El pacient TP-7 va presentar disfunció renal crònica ja que a partir del desè mes post-trasplantament va anar perdent funció renal progressivament fins a arribar a nivells de creatinina sèrica de 3.2 mg/dl a l'any i 2.5 mg/dl als dos anys post-trasplantament. Prèviament, al novè mes, es va observar un increment dels nivells de Fascina-1 en orina arribant a una nivells màxims de 150 µg/g creatinina al desè mes post-trasplantament, valors que van disminuir al l'onzé mes post-trasplantament (Figura 39, C).
- El pacient TP-17 també va anar perdent funció renal progressivament. A partir del 4t mes post-trasplantament el pacient va començar a perdre funció renal, passant d'uns nivells de creatinina sèrica de 0.71 mg/dl el 4t mes, a una valors de 2.14 mg/dl a l'any post-trasplantament. Aquest pacient va mostrar

un increment de Fascina-1 urinària el segon mes després del trasplantament mantenint-se els nivells elevats fins al quart mes. Després del quart mes post-trasplantament no es disposa de més mostres raó per la que no podem conèixer si posteriorment els nivells d'aquesta proteïna en orina es mantenen, incrementen o disminueixen (Figura 39, D).

Els resultats obtinguts en pacients trasplantats de pulmó suggereixen que la presència de Fascina-1 en orina podria indicar dany renal per fàrmacs anticalcineurínics reforçant els resultats obtinguts en l'apartat anterior. A més, hem observat que l'aparició de Fascina-1 és prèvia a episodis de disfunció renal en tres pacients trasplantats de pulmó. Aquest fet suggereix que Fascina-1 podria ser útil com a biomarcador primerenc de nefrotoxicitat per fàrmacs CNIs.

7. DETECCIÓ DE FASCINA-1 EN EXOSOMES DE PACIENTS TRASPLANTATS

Fascina-1 és una proteïna del citoesquelet, per tant, la seva presència en orina no es pot explicar per secreció. Una possible font de biomarcadors en orina són els exosomes. Aquestes vesícules extracel·lulars poden contenir proteïnes, metabòlits, mRNA i miRNA provinents dels compartiments intracel·lulars¹²⁹. Per tal de determinar si Fascina-1 s'alliberava a la orina mitjançant exosomes es van aïllar exosomes urinaris de dos pacients trasplantats de ronyó que tenien nivells elevats de Fascina-1 en orina i de dos controls sans. Les mostres d'orina utilitzades per aquest anàlisi eren posteriors a les utilitzades en els assajos ELISA ja que per aïllar exosomes és necessari obtenir la mostra d'orina i processar-la seguidament.

El procés d'aïllament d'exosomes es va realitzar per fraccionament per ultracentrifugació tal i com s'especifica en l'Apartat 5.2.2 de Materials, Mètodes i Pacients. La detecció de Fascina-1 es va realitzar per *Western Blot*, tant en la fracció que contenia els exosomes com del sobrenedant d'aquesta fracció. Per tal de conèixer si s'havien aïllat correctament els exosomes es va immunodetectar la proteïna TSG-101 (*Tumor susceptibility gene 101*) que es troba específicament en aquest tipus de vesícules.

A la Figura 40 es pot observar que en els carrils on es va carregar sobrenedant de la fracció d'exosomes no apareix senyal de TSG-101 fet que confirma que es van aïllar de forma correcta els exosomes de totes les mostres d'orina. Tal i com es pot observar en la Figura 40, es va detectar Fascina-1 en les mostres de pacients trasplantats de ronyó (mostres 1 i 2) però no en les mostres d'orina A i B que corresponien a voluntaris sans. Per tant, Fascina-1 apareix en exosomes de pacients trasplantats de ronyó.

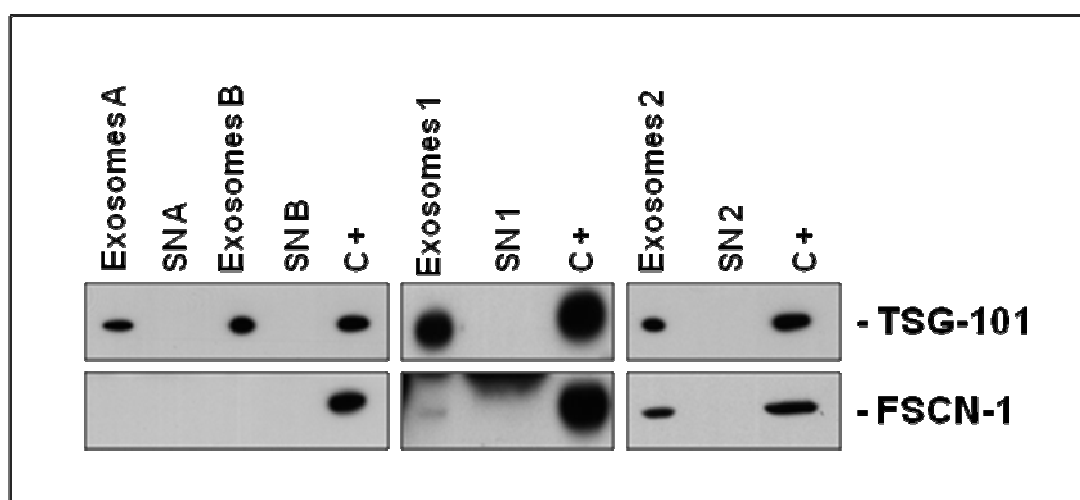


Figura 40. **Els pacients trasplantats de ronyó presenten Fascina-1 en els exosomes.** S'ha immunodetectat Fascina-1 i TSG-1 en exosomes derivats de mostres d'orina de pacients trasplantats de ronyó (1 i 2) i d'individus sans (A i B) i en el sobrenedant (SN) d'aquesta fracció. S'han utilitzat 20 µl d'extracte d'exosomes i 35 µl de sobrenedant. Com a control positiu (C+) s'ha utilitzat 5µg d'extracte cel·lular de cèl·lules d'HK-2. Els pacients trasplantats renals (1 i 2) presenten Fascina-1 en els exosomes provinents de la orina. En canvi, no s'ha observat Fascina-1 en els exosomes aïllats en mostres d'orina de voluntaris sans (A i B).

Per tal d'assegurar que la detecció de Fascina-1 en l'extracte d'exosomes era específica, es va bloquejar l'anticòs anti-Fascina-1 amb el pèptid immunogen. Es va repetir la immunodetecció de TSG-101 i de Fascina-1 (amb i sense bloqueig amb el pèptid) en la fracció d'exosomes i el sobrenedant de dita fracció del pacient trasplantat de ronyó 2. En la Figura 41, s'observa que quan l'anticòs anti-Fascina-1 és bloquejat amb el pèptid contra el que s'ha fabricat la senyal de Fascina-1 desapareix tant en l'extracte d'exosomes com en el control positiu (extracte de cèl·lules HK-2). Per tant, la immunodetecció de Fascina-1 en els exosomes aïllats d'orina de pacients trasplantats de ronyó és específica.

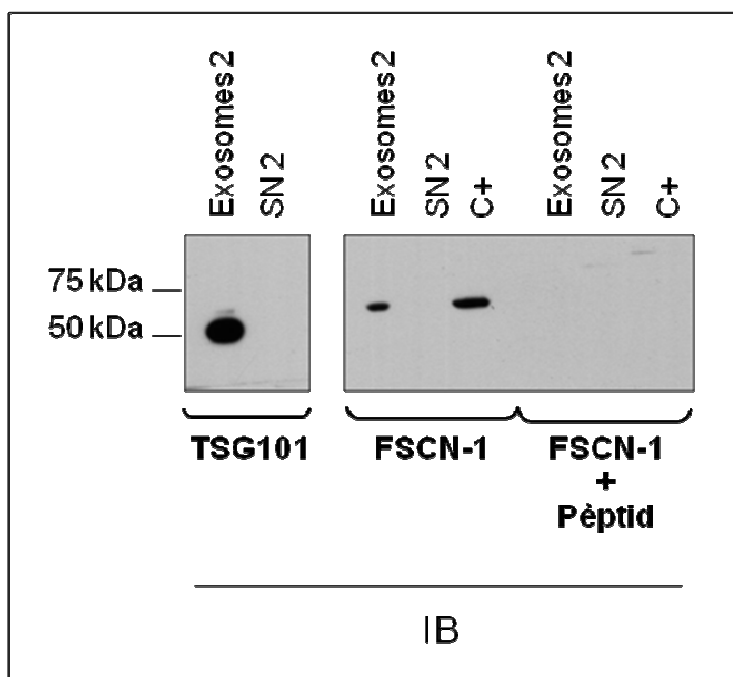


Figura 41. La detecció de Fascina-1 en exosomes aïllats d'orina de pacients trasplantats de ronyó és específica. S'ha immunodetectat en 20µl d'extracte d'exosomes, 35µl de sobrenedant (SN) i 5 µg d'extracte de cèl·lules HK-2 (C+) TSG-101 i Fascina-1. També s'ha realitzat el WB per Fascina-1 amb l'anticòs anti-Fascina-1 bloquejat amb el pèptid immunogen en una proporció pèptid:anticòs de 10:1. La senyal de Fascina-1 desapareix, tant en la fracció d'exosomes com en el control positiu, quan es bloqueja l'anticòs per Fascina-1 amb el pèptid. IB: Immunoblot.

8. ROL DE LA PROTEÏNA QUINASA C (PKC) EN L'ALLIBERACIÓ DE FASCINA-1 AL MEDI DE CULTIU DE CÈL·LULES HK-2

Fascina-1 pertany a la família de proteïnes *actin-crosslinking proteins*. Aquest tipus de proteïnes permeten disposar els filaments d'actina del citoesquelet formant xarxes o bandes. Concretament, Fascina-1 organitza els filaments d'actina paral·lelament per formar fibres. Aquesta capacitat es deu als dos dominis d'unió a filaments d'actina que posseeix, un a l'extrem N-terminal (aminoàcids del 33 al 47) i un al C-terminal (aminoàcids del 277 al 493).

Fascina-1 és fosforil·lada per la Proteïna Quinasa C (PKC), fonamentalment la forma *alpha*, pertanyent a les PKC convencionals o clàssiques, en la Serina 39 del seu extrem N-terminal. L'activació de la PKC regula les funcions d'assemblatge de les fibres d'actina dependents de Fascina-1, així, quan Fascina-1 està fosforil·lada

en la Serina 39 perd afinitat per les fibres d'actina. Per tant, l'activitat de PKC provoca que la cèl·lula no sigui capaç de formar bandes d'actina dependents de Fascina-1, tals com fibres d'estrès o protrusions corticals¹⁵¹.

Per altra banda, entre les diferents vies de senyalització activades en resposta a CNIs trobem la via de les PKCs⁹⁵. Hipotèticament, l'activació d'aquesta via per part dels CNIs podria intervenir en l'alliberament al medi de Fascina-1.

Per tal de veure si l'activació de la PKC podria tenir algun paper en l'alliberament al medi de Fascina-1 es van tractar les cèl·lules HK-2 amb *Phorbol 12-myristate 13-acetate* (PMA), un ester de forbol. Els esters de forbol són potents activadors de les Serina/treonina quinases (família a la que pertanyen les proteïnes quinasa C) ja que actuen de forma mimètica als diacilglicerols (DAG), segons missatgers d'aquestes quinases. Les cèl·lules HK-2 es van tractar amb PMA durant 1 hora en medi sense sèrum fetal boví. Per *Western blot* es va immunodetectar Fascina-1 en extracte cel·lular i en medi de cultiu. L'activació correcta de PKC es va determinar mitjançant la valoració de fosforil·lació i, per tant, l'estat d'activació de la quinasa ERK 1/2, quinasa efectora de la via de les PKC.

Com es pot observar a la Figura 42, al tractar les cèl·lules HK-2 amb PMA la quinasa ERK 1/2 es trobava dos vegades més activada que en les cèl·lules sense tractar (Figura 42, B), demostrant l'activació de la PKC. En la Figura 42 (A i D), es pot apreciar que el tractament amb esters de forbol produïa una increment significatiu de l'alliberament al medi de Fascina-1 sense afectar als nivells de Fascina-1 intracel·lular (Figura 42, C). Aquests resultats suggereixen que l'activació de PKC en cèl·lules HK-2 podria potenciar l'alliberament al medi de Fascina-1 provocada per fàrmacs CNI.

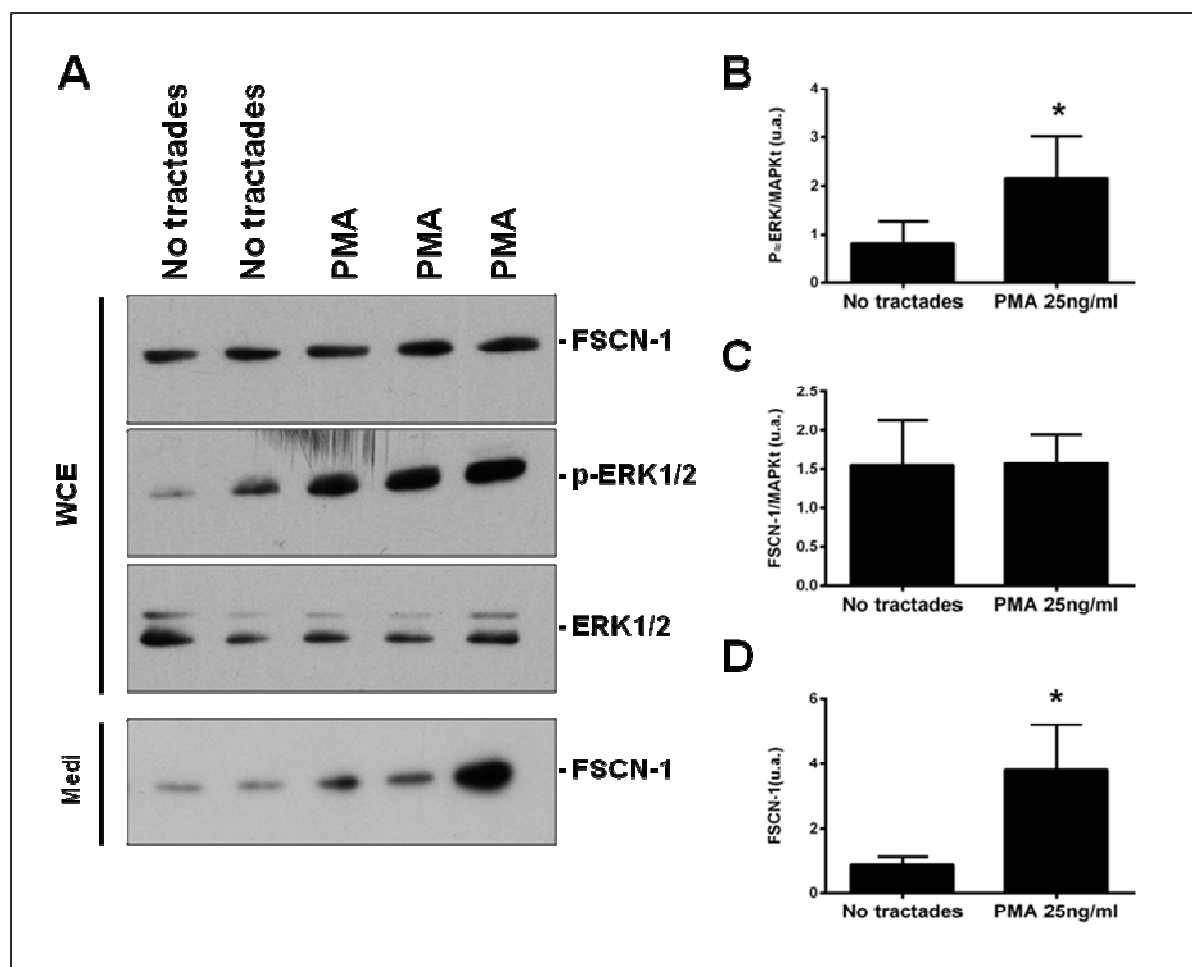


Figura 42. L'activació de PKC promou l'alliberament al medi de Fascina-1. S'han tractat les cèl·lules HK-2 durant 1h amb 25 ng/ml *Phorbol 12-myristate 13-acetate* (PMA) en medi sense sèrum fetal boví. Les cèl·lules control s'han tractat amb vehicle de dilució del PMA. S'ha detectat per WB Fascina-1, P-ERK1/2 i MAPK-total, i s'han utilitzat 5 µg d'extracte cel·lular (wce) i 30 µl de medi (A). Les bandes s'han quantificat utilitzant el *software quantity one*. Les absorbàncies de les bandes de Fascina-1 en extracte i P-ERK1/2 s'ha referit a MAPK-total. Les dades s'han analitzat per test T comparant els valors de les cèl·lules tractades amb PMA amb els obtinguts a les cèl·lules no tractades (*, p<0.05). Aquest experiment s'ha realitzat per duplicat amb tres rèpliques per condició. La quinasa ERK1/2 està més activada en les cèl·lules tractades amb PMA (B). Fascina-1 es troba en major concentració en el medi de les cèl·lules tractades amb PMA que en el medi de cèl·lules sense tractar (D). El tractament amb esters de forbol no afecta als nivells d'expressió de Fascina-1 (C).

DISCUSSIÓ

El trasplantament renal ha permès millorar la esperança i la qualitat de vida dels pacients amb insuficiència renal terminal respecte aquells pacients sotmesos a diàlisi. Tot i això, després d'un any post-trasplantament la majoria dels pacients trasplantats perden funció renal progressivament. Aquesta davallada de la funció renal s'ha anomenat nefropatia crònica de l'empelt (CAN, *chronic allograft nephropathy*). L'etiologia d'aquesta malaltia és poc clara ja que diversos factors poden influir en el la seva aparició i progressió. Els processos immunològics de rebuig, tenen un paper cabdal en el l'aparició de CAN. Altres factors influents són l'edat i el temps d'isquèmia al que ha estat sotmès l'òrgan trasplantat, les comorbiditats associades que pot presentar el pacient (diabetis, hipertensió, obesitat...) i la toxicitat sobre el ronyó que puguin produir determinats fàrmacs com ara els immunosupressors anticalcineurínics (CNIs). Probablement, la nefropatia crònica de l'empelt es dona per combinació de rebuig immunològic amb d'altres factors com els esmentats. La contribució de cada un dels factors és difícil de conèixer ja que les lesions que s'observen no són específiques i no existeixen, fins al moment, marcadors específics que permetin detectar el dany ocasionat per un factor concret.

La nefrotoxicitat per fàrmacs anticalcineurínics, la CsA i FK-506, va ser descrita poc després de la incorporació d'aquests fàrmacs a la pràctica clínica. La CsA i l'FK-506 produeixen un descens de la funció renal ja que produeixen vasoconstricció a nivell arteriolar i tenen efectes tòxics directes sobre les cèl·lules renals. Histològicament, les lesions més característiques són vacuolització isomètrica a nivell tubular i hialinosi arteriolar tot i que també poden produir altres tipus de dany com glomeruloesclerosi o microangiopatia trombòtica. L'administració crònica d'aquests fàrmacs és imprescindible per evitar el rebuig de l'empelt, però, alhora podria estar contribuint al desenvolupament de la nefropatia crònica de l'empelt en menor o major grau. Actualment, és impossible conèixer en quina proporció participa aquest tipus de nefrotoxicitat en la disfunció de l'empelt renal ja que, amb les tècniques diagnòstiques actuals, és difícil diferenciar aquest tipus de dany renal d'altres.

Pels antecedents esmentats i amb l'objectiu de poder distingir de forma primerenca el dany ocasionat per nefrotoxicitat per fàrmacs CNI es va proposar

l'estudi de les proteïnes secretades de cèl·lules tubulars en cultiu (HK-2) tractades amb CsA o FK-506 que podrien, hipotèticament, ser detectades en sang i/o orina de pacients immunosuprimits.

1. ESTUDI DEL MEDI CONDICIONAT DE CÈL·LULES TUBULARS PER A IDENTIFICAR NOUS BIOMARCADORS DE DANY RENAL

Els últims anys s'ha explotat l'anàlisi de contingut proteic de medis de línies cel·lulars en cultiu, per identificar biomarcadors per a diverses patologies com càncer, diabetis i malalties neurodegeneratives, entre d'altres. Aquesta metodologia és una aposta interessant pel fet que els models cel·lulars permeten simular de forma simplificada condicions experimentals complicades ja que no es veuen afectats per la complexitat d'un òrgan o organisme ni de les patologies secundàries associades a la malaltia d'interès. Les proteïnes secretades per les línies cel·lulars en condicions controlades podrien, potencialment, ser alliberades *in vivo* al torrent sanguini o d'altres fluids i ser útils com a indicador d'una patologia concreta.

A més, l'estudi dels medis condicionats o secretomes soluciona un dels problemes fonamentals de la cerca de biomarcadors directament a la sang o altres fluids: l'ampli rang dinàmic pel que fa a les concentracions de les proteïnes en dits fluids. Per exemple, l'anàlisi proteòmic del plasma és difícil ja que s'hi poden trobar una gran varietat de proteïnes però tant sols 22 d'elles suposen el 99% (l'albumina, les transferrines, les immunoglobulines i els factors del complement). Aquestes proteïnes poden emascarar proteïnes menys abundants que podrien ser indicadors d'una determinada patologia. Per evitar aquest efecte, en l'estudi proteòmic de proteïnes secretades per models cel·lulars en cultiu s'utilitzen medis sense FBS¹⁵⁸.

Estudis de validació clínica han reportat que algunes de les proteïnes identificades amb aquesta metodologia (com el canal de clor intracel·lular 1 (CLIC-1) per a càncer nasofaríngi o la proteïna associada al retinoblastoma 47 (RbAp-47) per a carcinoma pulmonar) detecten de forma molt específica i sensible la patologia d'interès com recullen Dowling & Clynes en una completa revisió¹⁵⁸.

Tot i les evidents avantatges, cal considerar les limitacions inherents d'aquests models. En el desenvolupament de la major part de malalties participen diferents tipus cel·lulars que interaccionen entre ells creant un ambient extracel·lular característic que no es dona en el cultiu. Cal tenir en compte també que utilitzant aquest tipus de models no es té en compte la senyalització entre cèl·lules. Per tant, no es detectaran mai biomarcadors secundaris de la malaltia d'interès produïts per senyalització de les cèl·lules diana a d'altres tipus cel·lulars. Aquestes situacions patològiques són difícils de simular en models en cultiu¹⁵⁸. Per tal de millorar alguns d'aquests aspectes, alguns autors han analitzat medis de cocultius de diferents tipus cel·lulars^{159,160} o de cultius en 3-D^{161,162}. Els cultius en 3-D permeten reproduir de forma més acurada que els cultius convencionals el microambient i les connexions entre cèl·lules que es produeixen *in vivo* ja que es cultiven les cèl·lules sobre matrius orgàniques flexibles¹⁶³. Finalment, es considera que existeix un cert percentatge (15-20%) de contaminació creuada en els models cel·lulars, es a dir, no totes les línies cel·lulars desenvolupades es mantenen pures. Això, pot portar a la identificació de proteïnes secretades que podrien no ser reflex del procés fisiopatològic de la malaltia d'estudi¹⁵⁸.

La metodologia emprada per a realitzar l'estudi del contingut proteic dels medis cel·lulars és diversa. Les cèl·lules, en general, es mantenen durant els experiments sense sèrum fetal boví ja que aquest emmascara proteïnes poc abundants en l'anàlisi proteòmic. El processat dels medis condicionats per tal de concentrar-ne el contingut proteic es pot realitzar per precipitació amb àcid tricloroacètic/acetona (TCA), per ultrafiltració o per liofilització, sent aquesta última tècnica la menys emprada. La precipitació amb TCA és un mètode efectiu però existeix una pèrdua de proteïnes variable en el passos de precipitació i de resolubilització que porta a certa variabilitat. Per això, en aquest treball es va realitzar per ultrafiltració ja que és el mètode més directe i reproducible¹⁵⁸.

L'anàlisi proteòmic dels medis condicionats es pot realitzar mitjançant diverses tècniques com 2D-PAGE, 2D-DIGE, SELDI-TOF-MS, mudPIT, etc. depenent de les necessitats¹⁵⁸. Si el que es vol realitzar és un anàlisi massiu d'alt rendiment (*High-throughput screening*) del contingut proteic les tècniques que s'utilitzen són SELDI-TOF-MS (*surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass*

spectrometry) o mudPIT (*Multidimensional Protein Identification Technology*) que permeten analitzar mesclades proteiques complexes de forma automatitzada amb alt grau de sensibilitat. El resultat d'aquestes tècniques són perfils proteics característics de cada condició experimental o mostra. A tall d'exemple, s'ha descrit un perfil proteic característic en el microambient del tumor mamari que permet diferenciar dones malaltes de càncer de mama de dones sanes¹⁶⁴. La composició exacta dels perfils és difícil de conèixer, sobretot si l'anàlisi es realitza SELDI-TOF-MS, ja que no es realitza una separació prèvia per cromatografia de les proteïnes de la mostra com en la tècnica del mudPIT. Aquest fet, limita la utilització d'aquestes tècniques per realitzar anàlisis proteics diferencials per identificar marcadors concrets. A tal efecte, són més efectives les tècniques de proteòmica bidimensional 2D-PAGE o 2D-DIGE que són mètodes més robustos. Mitjançant aquestes tècniques és separen les proteïnes per punt isoelèctric i per massa molecular fet que permet obtenir un mapa acurat del contingut proteic de la mostra on cada taca representa una isoforma concreta de cada proteïna. La tècnica 2D-DIGE (*Difference gel electrophoresis*) permet resoldre en el gel de poliacrilamida dues mostres a comparar en un mateix gel gràcies al pas previ de tinció fluorescent diferencial de les mostres. En aquest cas, les taques s'observen escanejant els gels utilitzant les longituds d'ona adequades per cada tinció. L'ús d'aquesta tècnica, minimitza la variabilitat inter-gels i evita haver de comparar els mapes proteòmics obtinguts entre ells¹⁶⁵. Tot i que 2D-DIGE té certs avantatges sobre la 2DE convencional, en el nostre cas no són suficients com per justificar l'important sobrecost que implica, ja que la complexitat del medi estudiat és baixa i la variabilitat inter-gels no provoca cap confusió en l'assignació de taques, i tampoc aporta cap millora en la resolució. Per tant, ens hem decantat finalment per la tècnica convencional, el 2D-PAGE.

En el camp de la fisiopatologia renal, alguns autors han utilitzat l'anàlisi del medi de cèl·lules renals per trobar nous biomarcadors o identificar els mecanismes subjacents a patologies renals. Sarkissian *et al.* van estudiar el secretoma de la línia cel·lular CAL 54, línia cel·lular humana derivada de carcinoma renal de cèl·lules clares (RCC), per tal d'identificar possibles marcadors pronòstics d'aquest tipus de carcinoma. Una de les proteïnes específicament secretades per aquesta línia cel·lular és la pro-metal·loproteinasa de matriu 7 (pro-MMP-7). En el mateix estudi,

van validar la seva utilitat com a biomarcador ja que van descriure un increment dels nivells d'aquesta proteïna en sang de pacients amb RCC en comparació amb individus sans. Per tant, pro-MMP-7 ha resultat ser un biomarcador sèric sensible i específic de RCC¹⁶⁶.

Lamoureux *et al.* van analitzar el medi de cèl·lules derivades de ronyó humà HEK-293 tractades amb 5 µM de CsA per tal d'identificar proteïnes indicadores de nefrotoxicitat per CsA. Entre les proteïnes identificades que incrementen la seva secreció troben la Ciclofilina A i B, el Factor inhibitori de la migració del macròfags (MIF, *Macrophage migration inhibition factor*) i el *Phosphatidylethanolamina-binding protein 1* (PEBP-1). Tot i que no realitzen la detecció d'aquestes proteïnes en sang o orina, els autors suggereixen que podrien ser útils com a biomarcadors de nefrotoxicitat per CsA¹⁶⁷. Tot i que la idea és la mateixa, aquest estudi és comparable tant sols en part amb el treball que es presenta. En primer lloc, van utilitzar HEK-293 que són cèl·lules derivades de teixit renal embrionari pel que no són tant bon model de la porció tubular com ho són les cèl·lules HK-2. En segon lloc, la tècnica que van utilitzar Lamoureux *et al.* en el seu estudi per a detectar les proteïnes diferencialment secretades per CsA es completament diferent al 2D-DIGE fet que podria explicar la raó per la que les proteïnes identificades en el nostre estudi no són les mateixes. Per detectar i quantificar les proteïnes diferencialment secretades van utilitzar la tècnica de marcatge de proteïnes SILAC (*Stable isotope labelling by aminoacids in cell culture*). La tècnica SILAC consisteix en marcar no radioactivament les proteïnes contingudes en una mostra proteica per tal de poder determinar i valorar en quina proporció varien cada una de les proteïnes comparant amb una mostra proteica no marcada. A tal efecte, durant el cultiu de les cèl·lules el medi de cultiu d'una de les condicions experimentals es suplementa amb aminoàcids marcats amb un isòtop estable no radioactiu de forma que les cèl·lules els incorporen a les proteïnes durant la seva síntesi. Un cop s'han cultivat les cèl·lules el temps suficient per a permetre la incorporació dels aminoàcids marcats a les proteïnes es realitza el tractament d'interès, es processa la mostra proteica i es separen els pèptids per cromatografia líquida (HPLC) on s'analitza quins pèptids són diferencials en cada cas. En l'estudi esmentat es va realitzar la separació dels pèptids continguts en els medis cel·lulars per cromatografia líquida en nanocapil·lars

(nano-HPLC) i un cop separats i detectats els pèptids que variaven per efecte de CsA es van identificar les proteïnes a les que pertanyien els pèptids per espectrometria de masses en tàndem (MALDI-TOF/TOF).

Certament, en l'estudi proteòmic que s'ha realitzat en aquest treball s'esperava identificar CypB com a proteïna diferencialment secretada per CsA (tot i que sí que l'hem detectada per WB, tal i com s'indica a la Figura 20). Probablement, la raó per la qual no es va detectar aquesta proteïna és que CypB té un punt isoelèctric al voltant de 10 (9.6). Entre els ph 10 i 11 la resolució de l'electroforesi bidimensional no és òptima fet que fa difícil detectar taques diferencials en aquesta zona. Una de les limitacions de la tècnica proteòmica emprada en aquest treball és la resolució a determinats rangs de pI. Altres proteïnes haurien pogut ser detectades si la resolució en aquestes zones hagués estat millor.

Lamoureux et al. suggereixen que CypB podria ser un bon indicador de dany renal per CsA¹⁶⁷. Aquesta afirmació cal considerar-la amb cautela ja que la secreció de ciclofilina B per efecte de la CsA va ser descrita fa aproximadament dues dècades per Price *et al.*¹⁶⁸ i des de llavors s'ha observat el mateix fenomen en diverses línies cel·lulars^{169,170}. Donat que CypB és secretada per efecte de CsA per diferents tipus cel·lulars és poc probable que el seu increment en plasma en pacients trasplantats es pugui atribuir a dany renal tubular per CNIs. A més, Cyp B s'ha trobat en fluids biològics com el plasma^{156,171} o la llet materna¹⁷². A la dècada dels 90, Denys *et al.* van demostrar que pacients trasplantats immunosuprimits amb CsA presentaven nivells més elevats de CypB en plasma que individus sans¹⁵⁶. Uns anys abans, els mateixos autors va descriure que CypB secretada potenciava l'acció immunosupressora de CsA¹⁷³. Per aquesta raó, van suggerir que l'increment en plasma de CypB en pacients contribuiria a l'acceptació i manteniment de l'òrgan trasplantat al millorar l'efecte de l'immunosupressor¹⁵⁶.

En el present treball, s'han identificat 4 proteïnes que es troben més presents en el medi de cèl·lules tubulars HK-2 condicionat per CsA que en el medi de cèl·lules tractades tant sols amb vehicle (Enolasa- α , *Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1*, Gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa i *Plasminogen Activator-inhibitor-1*) i dues que incrementen la seva secreció per efecte d'ambdós fàrmacs CNIs, CsA i

FK-506 (Fascina-1 i Fructosa-bifosfat aldolasa A). Per tal de triar les proteïnes a validar en pacients trasplantats de ronyó es van establir una sèrie de criteris. Per assegurar màxima especificitat en resposta als CNIs, es va tenir en compte que incrementessin la seva presència en medi de cèl·lules tractades amb CsA i/o FK-506 i no en el medi de les cèl·lules tractades amb Staurosporina, un conegut inductor d'apoptosi cel·lular. Per exemple, Fructosa-bifosfat aldolasa A incrementa significativament la seva presència en medi condicionat amb tots 3 fàrmacs raó per la que no es va escollir per a la validació en pacients. En alguns casos es va observar que, tot i que el *spot* era considerat significativament secretat per efecte de CsA o FK-506, la variació de DO es donava també en les tractades amb staurosporina. Per això, només es van considerar específicament secretades per CNIs aquelles proteïnes que tenien una variació de DO respecte a les cèl·lules no tractades superior a 1 en les cèl·lules tractades amb CsA/FK-506 vs control i igual o inferior a 1 en les cèl·lules tractades amb staurosporina vs control. En segon lloc, es van triar proteïnes no relacionades amb metabolisme mitocondrial ja que molts processos de mort cel·lular s'inicien quan s'alteren aquestes vies iniciant processos de mort cel·lular^{143,174}. Per aquesta raó, la presència d'aquestes proteïnes en el medi podria no indicar mort específica per CNIs. Finalment, es va realitzar una cerca bibliogràfica acurada de cada una d'elles per determinar si podien tenir algun paper en el desenvolupament de la toxicitat per fàrmacs anticalcineurínics i el dany renal.

Atenent als criteris descrits, es van escollir 2 proteïnes per testar la seva aparició en pacients trasplantats de ronyó o de pulmó: **Plasminogen-activator inhibitor-1 (PAI-1)** i **Fascina-1**. L'increment de Fascina-1 en medi de cèl·lules HK-2 tractades amb CsA o FK-506 es va demostrar també per *Western Blot* fet que dona robustesa al mètode utilitzat. No es va poder realitzar la detecció de PAI-1 en medi condicionat per CsA per tècniques alternatives ja que es van testar diferents anticossos contra PAI-1 i cap d'ells va resultar efectiu per a detectar aquesta proteïna.

2. PAPER DE PAI-1 EN PATOLOGIA RENAL

PAI-1 o Serpina E1 és una proteïna plasmàtica de 50 Kda que forma part de la família proteica de les serpine. Les serpine són proteïnes amb estructura similar i capacitat d'inhibir enzims amb activitat proteasa. PAI-1 és un component important del sistema plasminogen-plasmina ja que és l'inhibidor principal de la t-PA (*tissue-type plasminogen activator*) i la u-PA (*urokinase-type plasminogen activator*). Mitjançant la inhibició d'aquestes proteïnes PAI-1 inhibeix el procés de fibrinòlisi, contribuint a l'equilibri entre els processos sanguinis de coagulació i de fibrinòlisi (Figura 43). Aquest procés està implicat en fenòmens de migració i remodelat cel·lular en diversos processos biològics¹⁷⁵.

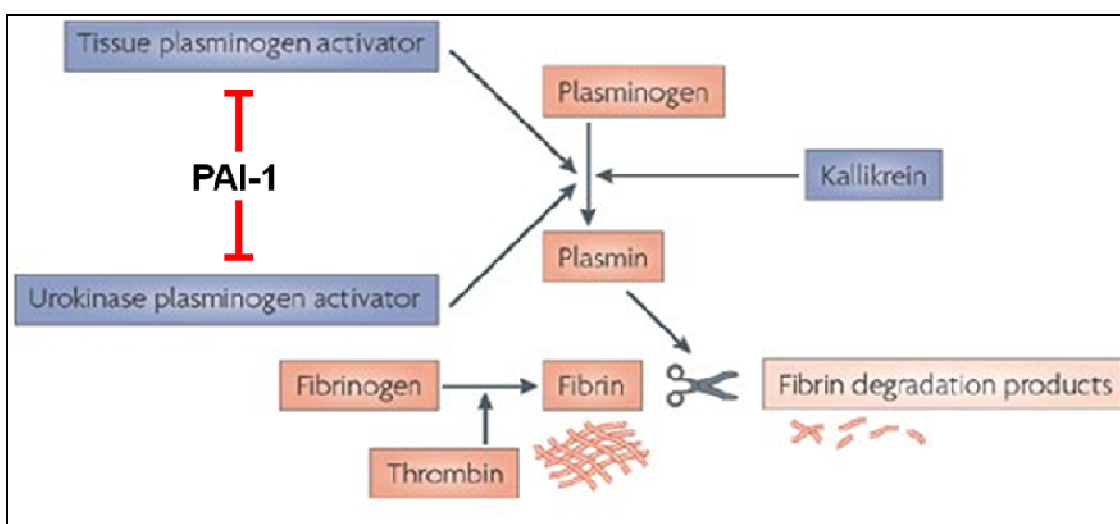


Figura 43. **Paper de PAI-1 en el procés de fibrinòlisi.** Els coàguls sanguinis es formen per acció de la proteïnasa trombina que transforma el fibrinogen soluble en fibrina insoluble. En el procés de fibrinòlisi, la fibrina insoluble es degradada per acció de la plasmina que es genera a partir de l'activació del seu precursor, el plasminogen. El plasminogen és activat per diferents factors que inclouen el t-PA (*tissue plasminogen activator*), u-PA (*urokinase plasminogen activator*) i la cal·licreïna. La *Plasminogen activator inhibitor-1* (PAI-1) inhibeix el procés de fibrinòlisi impedit l'activació de la plasmina per bloqueig de l'activitat de t-PA i u-PA (Extret i adaptat de Schäfer, M. i Werner, S. 2008¹⁷⁶).

Generalment, PAI-1 es troba en dues conformacions: PAI-1 activada, que s'uneix i inhibeix l'activitat de t-PA i u-PA, o PAI-1 latent, que no té efectes inhibitoris sobre dites proteïnes. També, s'ha descrit una tercera conformació de PAI-1 que s'uneix de forma no covalent als seus substrats (t-PA i u-PA) i genera altres efectes independents de la inhibició de la seva activitat¹⁷⁵. Tot i que PAI-1 és sintetitzada i

secretada en la forma activada, en condicions fisiològiques, ràpidament es transforma en la forma latent que té una vida mitja de 2h a 37°C.

En sang, PAI-1 es troba en plasma en forma activada i, sobretot en les plaquetes en forma latent. La concentració de PAI-1 plasmàtica és baixa, de 0 a 60ng/ml, i és produïda fonamentalment per cèl·lules endotelials¹⁷⁵ tot i que també la produeixen cèl·lules musculars llises, fibroblasts, monòcits/macròfags, adipòcits, hepatòcits i cardiomiòcits¹⁷⁷. La contribució de cada tipus cel·lular no es coneix exactament, però totes elles poden potencialment alliberar PAI-1 activada al plasma. La major proporció de PAI-1 en sang es troba emmagatzemada en les plaquetes (en una concentració de 200-300 ng/ml), però tant sols el 10% del contingut es troba en forma activada. Per tant, les plaquetes es poden considerar un reservori de PAI-1 latent. A la matriu extracel·lular dels teixits PAI-1 es pot trobar en forma activada estabilitzada per unió a la vitronectina¹⁷⁵.

PAI-1 té efectes sobre diferents teixits i es troba incrementada en sang en diverses patologies^{145,146}. Nivells elevats de PAI-1 en plasma produeixen una resposta fibrinolítica deficient i s'han relacionat amb diverses malalties cardiovasculars com l'infart de miocardi, la malaltia de les artèries coronàries i aterosclerosi, entre d'altres¹⁷⁵. S'ha descrit que PAI-1 té un rol important en malalties cardiovasculars i el síndrome metabòlic, entre d'altres^{145,175}. El síndrome metabòlic es defineix com el conjunt de diferents desordres metabòlics en un individu tals com diabetis tipus II, resistència a la insulina i obesitat amb cert grau d'activitat inflamatòria crònica¹⁷⁸. La expressió de PAI-1 es regula per diversos factors inflamatoris (TNF- α , IL-6, IL-1...) ^{145,177} fet que permet establir una connexió entre el síndrome metabòlic, els nivells elevats de PAI-1 en sang, la disminució del potencial fibrinolític i l'increment del risc cardiovascular¹⁷⁵.

En condicions fisiològiques, el ronyó no expressa PAI-1. S'ha descrit, però, que quan es produeix dany renal agut o crònic¹⁷⁹ tant sobre ronyons nadius^{146,180} com trasplantats¹⁸¹, PAI-1 s'expressa en tots els compartiments renals (glomèrul, túbul i interstici inflammat). En relació a la nefrotoxicitat per CNIs, estudis realitzats en les últimes dècades han mostrat que la CsA¹⁸²⁻¹⁸⁴ i l'FK-506¹⁸⁵ incrementen la expressió de PAI-1 al ronyó possiblement per acció del TGF- β ¹⁸⁶. L'increment de la expressió

de PAI-1 en teixit renal s'ha relacionat amb mal pronòstic ja que promou els processos de fibrosis al impedir la degradació de components de la matriu extracel·lular. En models murins, s'ha demostrat que ratolins deficients per PAI-1 tenen el ronyó menys fibrotic que ratolins *wild-type* 14 dies després de la realització d'una obstrucció ureteral unilateral. També s'ha demostrat que la manca de PAI-1 té un efecte beneficiós en models de nefropatia diabètica, de nefropatia per sobrecàrrega de proteïnes, de nefrectomies 5/6 (nefrectomia total d'un ronyó i 2/3 de l'altre) i en models de fibrosis espontània en animals transgènics per TGF- β ¹⁴⁷. Pontrelli *et al.* han descrit que els pacients trasplantats renals tractats amb rapamicina tenen menor expressió de PAI-1 renal i menys grau de fibrosi als 2 anys post-trasplantament que els pacients immunosuprimits amb CNIs¹⁸⁷. Tant estudis realitzats utilitzant animals de laboratori com estudis clínics suggereixen que aquesta proteïna podria ser una bona diana terapèutica per atenuar la fibrosi renal¹⁷⁹. Els nivells plasmàtics de PAI-1 s'han trobat incrementats també en diverses malalties renals agudes com la microangiopatia trombòtica, la vasculitis renal i la glomerulonefritis proliferativa¹⁴⁶.

En el present treball s'han avaluat els nivells de PAI-1 en sang i orina de pacients trasplantats de ronyó tractats amb fàrmacs CNIs, pacients amb disfunció renal crònica i individus sans. S'han comparat els nivells de PAI-1 de pacients trasplantats renals amb els nivells dels dos altres grups d'estudi amb l'objectiu final de relacionar els nivells de PAI-1 en sang o orina amb fenòmens de nefrotoxicitat per CsA o FK-506. Els nostres resultats mostren que els pacients trasplantats renals tenen nivells significativament més elevats de PAI-1 en sèrum que la resta de grups. Existeix certa controvèrsia en aquest sentit. Si bé els nostres resultats es troben recolzats per diversos treballs on s'ha descrit un increment de PAI-1 en sang de pacients trasplantats respecte a individus sans¹⁸⁸⁻¹⁹⁰, Perkowska *et al.* afirmen que no troben diferències en quant als nivells de PAI-1 entre pacients trasplantats de ronyó i individus sans. És més, descriuen que els pacients trasplantats tenen menor PAI-1 activada en sang¹⁴⁹. Aquesta discordança entre dades probablement es dona pel fet que, en pacients trasplantats, PAI-1 en plasma es pot trobar alterada per diversos factors secundaris associats com diabetis tipus II, hipertensió, dislipidemia, problemes cardiovasculars^{149,191}, per efecte fàrmacs com la CsA¹⁸² o els

glucocorticoides¹⁹², entre d'altres, donant una elevada variabilitat als nivells de PAI-1 en sang. Finalment, cal considerar també que els nivells sanguinis de PAI-1 també depenen d'un polimorfisme en la posició -675 *upstream* del lloc d'inici de transcripció del gen de PAI-1. En aquesta posició existeixen dues variants genètiques polimòrfiques: una repetició de 4 guanines (polimorfisme 4G) o repetició de 5 guanines (polimorfisme 5G). El genotip 5G/5G produeix que s'uneixi al promotor del gen el repressor transcripcional E2F reduint així els nivells d'expressió d'aquesta proteïna. Això repercuteix en els nivells sanguinis de PAI-1 ja que són més alts els dels individus amb genotip 4G/4G¹⁴⁶.

Els nostres resultats també mostren una lleugera correlació negativa entre els nivells de PAI-1 en sang i els nivells de creatinina en els pacients trasplantats de ronyó. La tendència observada explica només un percentatge baix de la variabilitat de PAI-1 en sang (R^2 ajustat de 5.2) i és feble (coeficient de correlació = - 0,28). Analitzant els nivells de PAI-1 sanguinis segons la indicació de la biòpsia, hem observat que els nivells de PAI-1 en sang són més elevats en aquells pacients als que se'ls va indicar la realització d'una biòpsia de seguiment en comparació als nivells dels pacients als que se'ls va biopsiar per deteriorament agut de la funció renal. Tot i no trobar una relació entre els nivells de PAI-1 sanguinis i el diagnòstic histopatològic seguint els criteris de Banff, hem observat nivells de PAI-1 en plasma superiors en aquells pacients sense signes de vacuolització isomètrica. Aquests resultats suggereixen que els pacients trasplantats amb nivells plasmàtics de PAI-1 elevats tenen millor pronòstic. Tot i això, cal considerar aquests resultats amb cautela. En primer lloc, perquè els nivells observats en el grup de pacients trasplantats renals es troben dins el rang de concentració esperat per a individus sans d'aquesta proteïna en sang (entre 0.320 i 8.560 ng/ml) i en segon lloc, perquè la majoria de treballs realitzats en trasplantament associen PAI-1 a pitjor pronòstic donada la seva relació amb les malalties cardiovasculars¹⁹³.

També s'han analitzat els nivells de PAI-1 en orina dels mateixos grups de pacients: pacients trasplantats de ronyó tractats amb fàrmacs CNIs, pacients amb disfunció renal crònica i individus sans. Els resultats aquí presentats suggereixen que l'aparició de PAI-1 en orina probablement es dona per pèrdua de proteïnes sanguínies durant el filtrat glomerular ja que els nivells de PAI-1 en sang són molt

superiors als urinaris en tots els grups estudiats i, a més, correlacionen fortament amb la proteïnúria en el grup de pacients trasplantats. Becker *et al.* van detectar un increment dels nivells de PAI-1 urinaris en pacients amb càncer de bufeta. Els nivells que van observar eren baixos, igual que els valors obtinguts en aquest estudi, i es van relacionar amb el grau d'hematúria dels pacients. L'estudi conclou que la mesura de PAI-1 en orina no és útil com a marcador pronòstic de càncer de bufeta¹⁹⁴. Els nivells de PAI-1 en orina obtinguts en el nostre estudi no s'han pogut relacionar amb cap tipus de lesió histològica ni amb els signes de nefrotoxicitat per CNIs suggerint que els nivells de PAI-1 urinaris no indiquen cap tipus de dany renal concret.

3. FASCINA-1 PODRIA INDICAR DANY RENAL PER FÀRMACS CNIS

En aquesta tesi també hem observat que la proteïna Fascina-1 es troba en major abundància en medis de cèl·lules tubulars tractades amb els dos fàrmacs CNIs, CsA i FK-506.

Fascina-1 és una proteïna estructural de 55 kDa que forma part de la família de proteïnes *Actin Cross-linking Proteins*. Les proteïnes d'aquesta família són responsables de la organització del citoesquelet d'actina en xarxes o en bandes (Figura 44). Fascina-1 disposa els filaments d'actina en bandes paral·leles i té un paper fonamental en la formació de fil·lopodis, lamelipodis i dendrites, entre d'altres protrusions cel·lulars. A més a més, regula l'estabilitat d'unions cel·lulars, com adhesions focals o podosomes, en funció de la naturalesa de la matriu extracel·lular¹⁹⁵ i té un paper fonamental en nombrosos processos cel·lulars fisiopatològics dependents d'actina, tals com motilitat cel·lular, migració i invasió, ja que promou la formació i estabilització de fibres riques en F-actina¹⁹⁶.

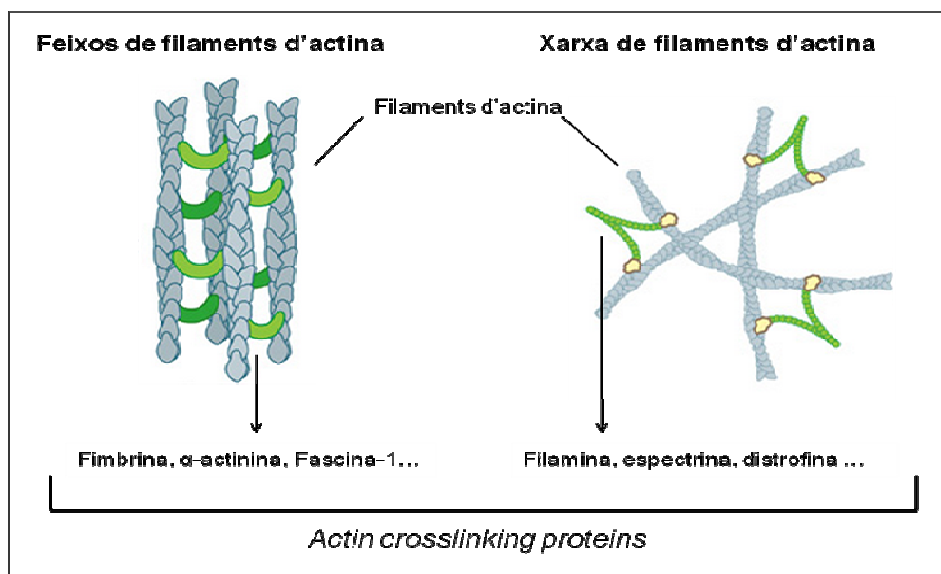


Figura 44. **Organització del citoesquelet d'actina i *actin crosslinking proteins***. Els filaments d'actina es poden organitzar formant filaments o xarxes. Les proteïnes que permeten l'estructuració del citoesquelet d'actina són les *actin crosslinking proteins*.

En condicions fisiològiques, Fascina-1 és expressada per cèl·lules endotelials vasculars, neuronals, fibroblasts, dendrítiques i per teixits mesenquimals però és absent en cèl·lules epitelials ben diferenciades^{196,197}. La sobre-expressió de Fascina-1 es relaciona amb fenotip agressiu en diferents tipus de càncer¹⁹⁸⁻²⁰⁰. En càncer de mama i en hepatocarcinoma s'ha demostrat que Fascina-1 promou el procés de transició epiteli-mesenquima^{153,201}. Qualtrough *et al.* han descrit que Fascina-1 es troba sobre-expressada en àrees de regeneració intestinal en malaltia inflamatòria de l'intestí. Els autors suggereixen que Fascina-1 podria ser rellevant en processos de desdiferenciació i migració cel·lular tant patològics com no patològics²⁰². Donat que els fàrmacs CNIs són capaços d'induir processos de EMT tals com els que acabem de descriure, es va considerar que Fascina-1 podria ser una bona candidata com a biomarcador precoç dels efectes nocius dels CNIs.

En el present treball, s'han comparat els nivells sanguinis i urinaris de Fascina-1 dels pacients trasplantats de ronyó immunosuprimits amb CNIs amb els de pacients amb dany renal crònic i amb els d'individus sans amb l'objectiu de poder relacionar-los amb processos de nefrotoxicitat per CNIs. Tal i com s'indica en l'apartat de resultats, no s'han observat variacions en quant als nivells de Fascina-1 en sang entre els diferents grups de pacients inclosos en l'estudi. Tampoc s'han pogut relacionar els nivells plasmàtics de Fascina-1 amb marcadors de funció renals

coneguts, ni amb la indicació mèdica de la biòpsia, ni amb el diagnòstic histopatològic dels pacients trasplantats de ronyó seguint de Banff, ni amb signes de nefrotoxicitat per CNIs. Donat que Fascina-1 és una proteïna estructural no s'han trobat antecedents en la literatura existent en quant als nivells d'aquesta proteïna en sang. En un estudi de 2005, similar al que es presenta, es va detectar Fascina-1 en plasma. Els autors van realitzar inicialment un estudi proteòmic en una dimensió del medi de cèl·lules derivades de carcinoma pulmonar amb l'objectiu d'identificar biomarcadors en sang per dita malaltia. Entre les proteïnes diferencialment secretades van trobar Fascina-1. Posteriorment, van detectar per ELISA semiquantitatiu Fascina-1 en mostres de sang en pacients amb càncer de pulmó. Tot i detectar-la en sang, els autors presenten les dades obtingudes en valors d'absorbància a 450/570 nm²⁰³. Per tant, aquest estudi no és útil per contrastar els nivells de Fascina-1 obtinguts però confirma que, tot i que és una proteïna intracel·lular, es pot trobar en sang.

Contràriament al que hem observat en sang, sí que hem pogut establir una relació entre els nivells urinaris de Fascina-1 i la nefrotoxicitat per CNIs. Els pacients trasplantats amb signes de vacuolització isomètrica tenen nivells significativament més elevats de Fascina-1 en orina i correlacionen amb els nivells plasmàtics de FK-506 en sang. Els nivells urinaris observats en el grup de pacients trasplantats són significativament superiors als sanguinis fet que fa pensar que la Fascina-1 en orina és d'origen renal, és a dir, no apareix per pèrdua de proteïnes plasmàtiques durant el filtrat glomerular. Per altra banda, no es relaciona amb la proteïnúria ni amb altres marcadors de disfunció renal, ni amb el diagnòstic histopatològic seguint els criteris de Banff.

Per tal de confirmar els resultats obtinguts en pacients trasplantats de ronyó s'han analitzat els nivells de Fascina-1 en mostres seriades de sang i orina de pacients trasplantats de pulmó. En aquest grup de pacients, el ronyó està sotmès tant sols a la noxa "fàrmac immunosupressor CNI", fet que permet analitzar més específicament els efectes nefrotòxics d'aquests fàrmacs. Realitzant una valoració qualitativa, vam observar que en 3 dels 6 pacients trasplantats de pulmó els nivells de Fascina-1 en orina incrementaven prèviament als nivells de creatinina sèrica suggerint que els nivells urinaris de Fascina-1 podrien indicar de forma pronostica

pèrdua de la funció renal. Per tal d'identificar biomarcadors primerencs, una de les premisses que es va considerar al inici de l'estudi és que les proteïnes detectades fossin secretades per cèl·lules tubulars per efecte dels fàrmacs CNIs però en condicions pretòxiques. Per tant, els resultats obtinguts en pacients trasplantats de pulmó donen robustesa al mètode de cerca de biomarcadors utilitzat ja que l'aparició de Fascina-1 en orina podria permetre predir la pèrdua de funció renal produïda per CNIs. Aquests resultats recolzen els obtinguts en pacients trasplantats de ronyó on hem observat que l'aparició de Fascina-1 en orina es relaciona amb signes de nefrotoxicitat per CNIs.

3.1. ORIGEN DE LA FASCINA-1 URINÀRIA EN PACIENTS TRASPLANTATS

Com ja s'ha esmentat, Fascina-1 és una proteïna del citoesquelet i com a tal no té senyal de secreció fet que planteja quin és l'origen d'aquesta proteïna tant al medi de cèl·lules tubulars en cultiu com en orina de pacients trasplantats. Gràcies a resultats d'altres estudis proteòmics de medis cel·lulars, es coneix que tant sols els 20 % de les proteïnes contingudes en medis de cultiu tenen pèptid senyal, el 80 % restant s'alliberen al medi per vies alternatives¹⁵⁸. El coneixement de la existència vesícules extracel·lulars, per exemple les microvesícules o els exosomes, permet explicar la presència de proteïnes no secretades en fluïds biològics i obre un ampli ventall de possibilitats en la cerca de nous biomarcadors. Aquest tipus de vesícules poden transportar proteïnes estructurals, molècules de mRNAs i miRNAs per fluïds com la sang, la limfa i la orina¹²⁷. Els exosomes urinaris s'alliberen a l'espai urinari a partir dels diferents epitelis renals, tant tubulars com de les vies urinàries¹³². Aquestes vesícules contenen sobre el 3 % de les proteïnes de la orina d'individus sans però al aïllar-les el seu contingut es concentra 30 vegades permetent la detecció de proteïnes rares que podrien tenir un alt valor diagnòstic²⁰⁴.

Fins al moment no s'ha detectat Fascina-1 en exosomes urinaris però s'ha descrit la presència de Fascina-1 en exosomes aïllats en medi de cèl·lules en cultiu tals com limfòcits B²⁰⁵, cèl·lules derivades de càncer de bufeta urinària²⁰⁶ i de mesotelioma²⁰⁷. En aquesta tesi, hem demostrat la presència de Fascina-1 en l'interior dels exosomes urinaris en determinats casos de pacients trasplantats de ronyó sota règim immunosupressor CNI. No s'ha pogut detectar Fascina-1 en el sobrenadant de

la fracció que contenia els exosomes, per tant, probablement aquesta proteïna s'allibera a la orina mitjançant la formació d'aquest tipus de vesícules extracel·lulars.

En condicions normals, Fascina-1 no s'expressa en el compartiment tubular ni en l'intersticial, tant sols s'expressa a nivell glomerular. L'aparell urogenital tampoc mostra expressió d'aquesta proteïna¹⁹⁷. Així, els nivells basals de Fascina-1 detectats en orina d'individus sans tindrien origen glomerular ja que és l'únic compartiment renal que expressa Fascina-1 en condicions no patològiques. En condicions patològiques, tals com ronyons trasplantats inflamats²⁰⁸ o casos de carcinoma renal^{209,210} i càncers de les vies urinàries i genitals^{198,211–213}, s'ha detectat presència de Fascina-1 d'altres compartiments renals. En ronyons trasplantats inflamats s'ha observat infiltració de cèl·lules dendrítiques positives per Fascina-1²⁰⁸. Les cèl·lules dendrítiques indueixen expressió de Fascina-1 a mesura que maduren a diferència d'altres cèl·lules immunològiques. En aquest tipus cel·lular, es considera que Fascina-1 té funcions fonamentals en la presentació d'antígens i la infiltració de cèl·lules dendrítiques en nòduls limfàtics²¹⁴. Tot i que la diferència no resulta significativa per la àmplia variància de les dades, els nivells de Fascina-1 en orina han resultat ser més elevats en pacients trasplantats de ronyó. Tot i això, no s'han observat nivells més elevats de Fascina-1 urinària en el grup de pacients trasplantats de ronyó amb diagnòstic histopatològic de “rebuig immunològic”. Per aquesta raó és poc probable que l'origen de Fascina-1 en orina siguin cèl·lules dendrítiques infiltrades a l'empelt renal. Tampoc es probable que la presència de Fascina-1 en orina sigui deguda a processos tumorals ja que no s'ha inclòs en l'estudi cap pacient amb qualsevol tipus de càncer diagnosticat.

Els fàrmacs CNI indueixen transició epiteli-mesènquima (EMT) sobre cèl·lules tubulars tant *in vitro*^{215,216} com *in vivo*⁹⁸. Per alta banda, com s'ha esmentat a l'inici d'aquest capítol, es coneix que Fascina-1 té un paper important en processos de EMT fisiopatològics^{153,201,202}. Per tant, la major presència de Fascina-1 en orina de pacients en règim immunosupressor CNI podria ser deguda als fenòmens de reorganització del citoesquelet subjacents als canvis fenotípics de les cèl·lules de l'epiteli tubular. Per contrastar aquesta hipòtesi caldria conèixer si Fascina-1 s'expressa en cèl·lules tubulars de l'empelt renal i si correlacionen amb marcadors moleculars de EMT.

3.2. MODEL DE MECANISME D'INCORPORACIÓ DE FASCINA-1 ALS EXOSOMES URINARIS

Considerant que Fascina-1 urinària observada en pacients tractats amb CNIs tingués el seu origen en cèl·lules tubulars en procés de desdiferenciació, una altra incògnita seria el mecanisme pel qual és alliberada a la llum del túbul mitjançant exosomes. Com hem esmentat anteriorment, els canvis en l'organització del citoesquelet propis de la EMT podrien produir la inclusió de Fascina-1 en exosomes. La capacitat de Fascina-1 de modular el citoesquelet d'actina en fibres depèn de l'activitat de la Proteïna Quinasa C (PKC). Fascina-1 és fosforilada per aquesta quinasa en el residu serina 39 del domini N-terminal d'unió als filaments d'actina. Per tant, Fascina-1 fosforilada no té capacitat de formar fibres d'actina¹⁹⁶. En aquesta tesi, hem demostrat que al activar la PKC amb esters de forbol la presència de Fascina-1 incrementa en el medi de les cèl·lules HK-2. Aquests resultats suggereixen que l'alliberació al medi de Fascina-1 és depenent de l'activació de PKC. Per altra banda, Zhang *et al.* han identificat que la proteïna Rab35 interacciona amb la proteïna *Singed*, l'homòleg de Fascina-1 de *Drosophila Melanogaster*²¹⁷. La proteïna Rab35 forma part de la família de GTPases petites responsables del transport intracel·lular entre orgànuls. Té funcions diverses, per una banda, és responsable del reciclatge de la membrana plasmàtica i de receptors i per altra banda sembla que té un paper fonamental en la modulació del citoesquelet d'actina durant la citocinesis i en d'altres processos cel·lulars. La recent descoberta que Fascina-1 és una proteïna efectora de Rab35 ha permès comprendre millor de quina forma regula la dinàmica de polimerització de l'actina²¹⁸. Sembla que Rab35 reclutaria els monòmers d'actina cap als focus de polimerització de les fibres d'actina²¹⁷. Recentment, s'ha observat que Rab35 regula la formació d'exosomes en cèl·lules oligodendroglials en cultiu. El bloqueig de l'activitat de Rab35 genera acumulació intracel·lular de vesícules endosomals i bloqueja la formació d'exosomes en aquest tipus de cèl·lules²¹⁹. Hipotèticament, Rab35 podria estar reclutant Fascina-1 per a generar fibres d'actina durant el procés de transició epiteli-mesenquima i, paral·lelament, transportar Fascina-1 fosforilada per la via de biogènesi d'exosomes cap a l'espai extracel·lular (veure model proposat a la Figura 45). Curiosament, en un estudi amb l'objectiu d'estudiar la formació d'exosomes en limfòcits B s'ha

detectat Rab35 i Fascina-1 en dits exosomes²⁰⁵. Rab35 també s'ha detectat en exosomes derivats de cèl·lules de càncer colorectal^{220,221} i d'orina^{129,222}. En certa forma aquesta hipòtesi podria explicar el fet que Fascina-1 es relacioni amb vacuolització isomètrica ja que aquest signe de dany renal per CNIs és a nivell cel·lular un increment de la formació de vesícules intracel·lulars³⁸.

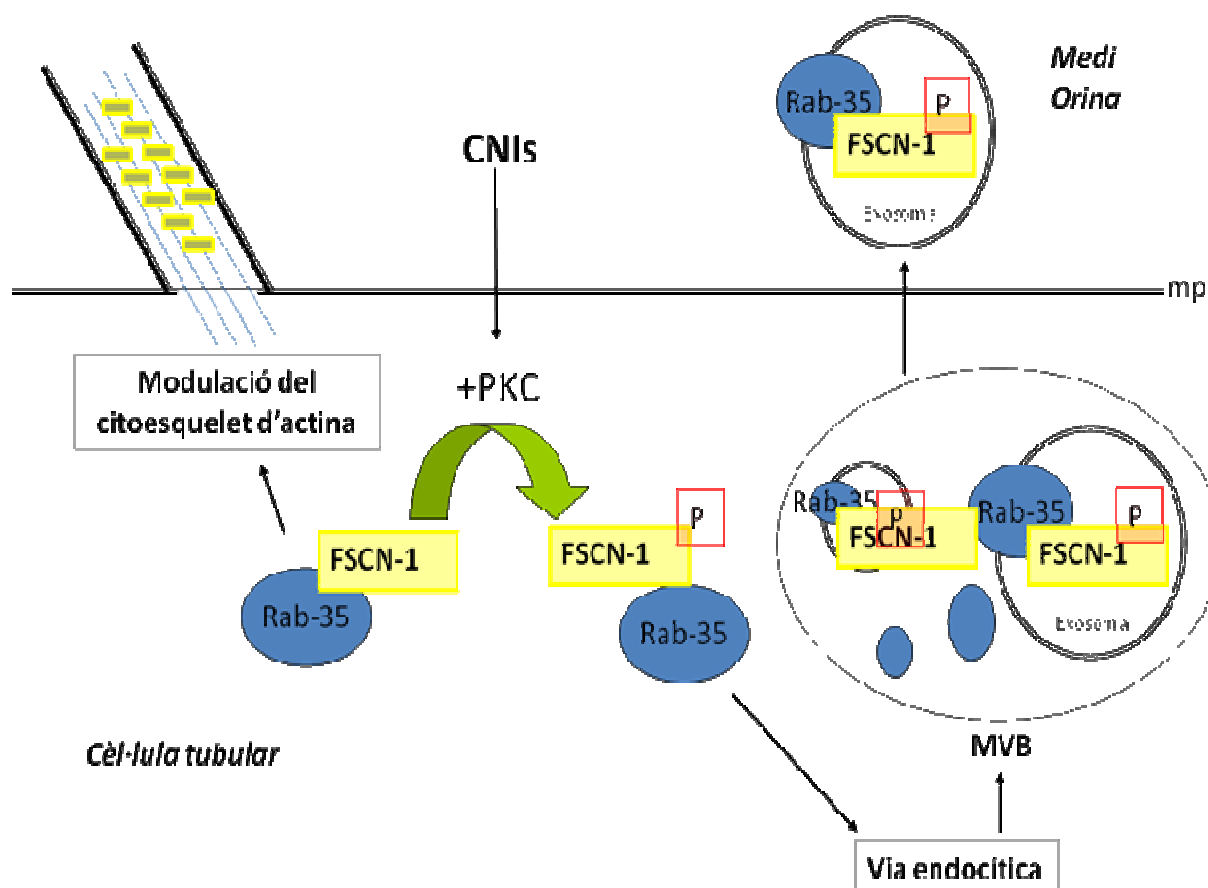


Figura 45. L'alliberament de Fascina-1 a l'espai extracel·lular podria dependre de l'activació de la proteïna quinasa C i de Rab35. Hipotèticament, Rab35 podria reclutar Fascina-1 cap als punts de formació de feixos d'actina i, alhora, transportar Fascina-1 fosforilada per la via endocítica. En el context de toxicitat per CNIs podria passar que s'acumulés Fascina-1 fosforilada ja que aquests fàrmacs activen la proteïna quinasa C (PKC) que és responsable de la fosforilació de Fascina-1. Aquest excés de Fascina-1 fosforilada podria ser alliberada al medi extracel·lular mitjançant exosomes. *MVB*: multivesicular body. *Mp*: membrana plasmàtica.

Evidentment aquesta teoria necessita de major experimentació per a ser comprovada. En primer lloc, caldria verificar que realment Fascina-1 apareix en medi de cultiu de cèl·lules HK-2 mitjançant exosomes. De ser cert, testar inhibidors de l'activitat PKC per tal conèixer si l'efecte observat per acció dels fàrmacs CNIs és dependent de PKC. Finalment, s'hauria determinar si la formació d'exosomes en les condicions de l'assaig són regulades per aquesta proteïna.

Per últim, cal considerar que Fascina-1 interacciona amb certs tipus de fàrmacs. Fascina-1 és molècula diana d'anàlegs Migrastatina¹⁵⁴ i del derivat 5k del Thiazol²²³, ambdós amb efectes antimetastàtics. Donat que CsA i FK-506 són macròlids com els dos fàrmacs esmentats, no es pot descartar que provoquin un efecte directe sobre Fascina-1 per interacció amb el seu domini d'unió amb fàrmacs interrompent el correcte funcionament i distribució subcel·lular de Fascina-1 sense necessitat d'activació de cap via de senyalització. En un futur, caldria comprovar o descartar que els fàrmacs CNI interaccionen directament amb Fascina-1.

Considerant els resultats obtinguts globalment, podem concloure que la metodologia basada en l'anàlisi proteòmic dels medis cel·lulars condicionats per CNIs com a pas previ a l'estudi en pacients ha resultat útil per a identificar nous biomarcadors. Hem detectat diverses proteïnes secretades per cèl·lules tubulars humanes en cultiu (HK-2) tractades amb fàrmacs CNIs en condicions pretòxiques. Potencialment, totes elles podrien ser útils com a biomarcador però es van escollir per a analitzar en mostres de sang i orina de pacients tant sols aquelles que la seva secreció tenia un major grau d'especificitat i que, per antecedents en la bibliografia, podrien tenir algun significat en patologia renal. Aquestes proteïnes van ser PAI-1 i Fascina-1. Encara que hem pogut avaluar els nivells de les dues proteïnes en mostres de sang i orina, tant sols hem pogut relacionar els nivells de Fascina-1 en orina amb dany renal per fàrmacs CNIs. En pacients trasplantats de ronyó, nivells més elevats de Fascina-1 en orina es relacionen amb presència de vacuolització isomètrica. A més, els nivells urinaris de Fascina-1 correlacionen amb els nivells sistèmics de FK-506. Gràcies a l'anàlisi dels nivells de d'aquesta proteïna en mostres seriades d'orina de pacients trasplantats de pulmó s'ha pogut comprovar d'una manera qualitativa que l'increment de Fascina-1 en orina es previ a la pèrdua de la funció renal. Per tant, els nivells de Fascina-1 en orina sembla que podrien indicar disfunció renal causada per fàrmacs anticalcineurínics de forma primerenca, complint així els requisits marcats als objectius inicials.

CONCLUSIONS

1. Les dosis sub tòxiques a 24 h tractament de CsA, FK-506 i Staurosporina sobre cèl·lules tubulars humanes en cultiu (HK-2) determinades en aquesta tesi són 5 μ M, 30 μ M i 1 nM, respectivament.
2. Mitjançant l'anàlisi proteòmic diferencial dels medis condicionats de cèl·lules HK-2 tractades amb les dosis sub tòxiques anteriorment esmentades, s'ha detectat, entre d'altres, la presència en el medi de PAI-1 en tractar les cèl·lules amb CsA i de Fascina-1 en tractar les cèl·lules tant amb CsA com en FK-506.
3. Nivells elevats de PAI-1 en sang de pacients trasplantats de ronyó podrien indicar una millor funció renal al correlacionar de forma inversa amb els nivells de creatinina sèrica.
4. PAI-1 probablement apareixeria en orina de pacients trasplantats per pèrdua de proteïnes plasmàtiques durant el procés de filtrat glomerular ja que els seus nivells en orina correlacionen fortament amb la concentració proteica de la orina.
5. L'aparició de Fascina-1 en orina de pacients trasplantats podria indicar dany renal per fàrmacs anticalcineurínics al relacionar-se amb signes histològics de nefrotoxicitat per aquest tipus de fàrmacs.
6. Fascina-1 en orina podria ser indicador precoç de nefrotoxicitat per fàrmacs anticalcineurínics ja que apareix en orina previament a episodis de disfunció renal en pacients trasplantats de pulmó.
7. Fascina-1 en orina probablement s'alliberaria a la orina mitjançant exosomes.
8. La proteïna quinasa C podria tenir un rol en l'alliberament de Fascina-1 al medi de cèl·lules HK-2 induïda per fàrmacs CNIs.

BIBLIOGRAFIA

1. Solé i Balcells, F. Aparell urinari. a *Enciclopèdia de Medicina i Salut Vol. 6*, 11–24 (Enciclopèdia Catalana, 1990).
2. Arévalo, M. El riñón normal. Anatomía e histología. a *Nefrología Clínica* 3–9 (Editorial Médica Panamericana, S.A., 2003).
3. Frayn, K. N. Características metabólicas de los órganos y tejidos. a *Regulación del Metabolismo. Una Perspectiva Humana* 87–89 (Ediciones Omega, S.A., 1998).
4. López, J. M. & Rodríguez, D. Función renal: conceptos generales. a *Nefrología Clínica* 19–35 (Editorial Médica Panamericana, S.A., 2003).
5. Solé i Balcells, F. Malalties i trastorns dels ronyons. a *Enciclopèdia de Medicina i Salut Vol.6*, 56–103 (Enciclopèdia Catalana,1990).
6. Liaño, F. & Pascual, J. Fracaso renal agudo: concepto y epidemiología. a *Nefrología Clínica* 637–639 (Editorial Médica Panamericana, S.A., 2003).
7. Praga, M. Causas de insuficiencia renal crónica y sus mecanismos de progresión. a *Nefrología Clínica* 697–706 (Editorial Médica Panamericana, S.A., 2003).
8. Hernando, L. Procedimiento diagnóstico en el enfermo con insuficiencia renal crónica. a *Nefrología Clínica* 693–695 (Editorial Médica Panamericana, S.A., 2003).
9. Hodgkins, K. S. & Schnaper, H. W. Tubulointerstitial injury and the progression of chronic kidney disease. *Pediatric nephrology (Berlin, Germany)* 27, 901–9 (2012).
10. Villa, G., Rodríguez-Carmona, A., Fernández-Ortiz, L., Cuervo, J., Rebollo, P., Otero, A. & Arrieta, J. Cost analysis of the Spanish renal replacement therapy programme. *Nephrology, dialysis, transplantation: official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 26, 3709–14 (2011).
11. Organización Nacional de Trasplante. Trasplante Renal. a *Memoria de actividad ONT 2011*, 1–20 (2011).
12. Shurraw, S. & Zimmerman, D. Vascular access complications in daily dialysis: a systematic review of the literature. *The Italian journal of urology and nephrology* 57, 151–63 (2005).
13. Gago, E. & Alvarez Grande, J. Complicaciones agudas en hemodiálisis. *Nefrología XI*, 9–16 (1991).

14. Taylor, S. M., Eaves, G. L., Weatherford, D. A., McAlhany, J. C., Russell, H. E. & Langan, E. M. Results and complications of arteriovenous access dialysis grafts in the lower extremity: a five year review. *The American surgeon* 62, 188–91 (1996).
15. Miranda, B., Vilardell, J. & Grinyó, J. M. Optimizing cadaveric organ procurement: the catalan and Spanish experience. *American journal of transplantation: official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 3, 1189–96 (2003).
16. De Francisco, A. L. M. & Piñera, C. Nephrology around Europe: organization models and management strategies: Spain. *Journal of nephrology* 24, 438–45 (2011).
17. Manyalich, M., Mestres, C. A., Ballesté, C., Páez, G., Valero, R. & Gómez, M. P. Organ procurement: Spanish transplant procurement management. *Asian cardiovascular & thoracic annals* 19, 268–78 (2011).
18. Mizraji, R., Pérez, S. & Alvarez, I. Brain death: epidemiology and quality control of solid organ donor generation. *Transplantation proceedings* 36, 1641–4 (2004).
19. Organización Nacional de Transplante. *Donación en asistolia en España: situación actual y recomendaciones. Documento de Consenso Nacional 2012.* (2012).
20. Nuñez, J. R., Del Rio, F., Lopez, E., Moreno, M. A., Soria, A. & Parra, D. Non-heart-beating donors: an excellent choice to increase the donor pool. *Transplantation proceedings* 37, 3651–4 (2005).
21. Gentil Govantes, M. Á. & Pereira Palomo, P. Assessment and selection of kidney living donors. *Nefrología* 30 Suppl 2, 47–59 (2010).
22. Maathuis, M.-H. J., Leuvenink, H. G. D. & Ploeg, R. J. Perspectives in organ preservation. *Transplantation* 83, 1289–98 (2007).
23. Organización Nacional de Transplante. *Criterios de selección del donante de organos respecto a la transmisión de infecciones.* (2004).
24. Organización Nacional de Transplante. *Criterios para prevenir la transmisión de enfermedades neoplásicas en la donación de órganos.* (2006).
25. Kälble, T., Alcaraz, A., Budde, K., Humke, U., Karam, G., Lucan, M., Nicita, G. & Süsal, C. *Guía clínica sobre el trasplante renal.* 1074–1176 (2010).
26. Karatzas, T., Bokos, J., Katsargyris, A., Diles, K., Sotirchos, G., Barlas, A., Theodoropoulou, E., Boletis, J. & Zavos, G. Advanced donor age alone is not a

- risk factor for graft survival in kidney transplantation. *Transplantation proceedings* 43, 1537–43 (2011).
27. Alexander, J. W., Bennett, L. E. & Breen, T. J. Effect of donor age on outcome of kidney transplantation. A two-year analysis of transplants reported to the United Network for Organ Sharing Registry. *Transplantation* 57, 871–6 (1994).
 28. Cruzado, J. M., Martorell, J. & Grinyó, J. . Inmunología del trasplante y bases del tratamiento inmunosupresor. a *Nefrología Clínica* 851–862 (Editorial Médica Panamericana, S.A., 2003).
 29. Kahan, B. D. Individuality: the barrier to optimal immunosuppression. *Nature reviews. Immunology* 3, 831–8 (2003).
 30. Oscarson, M. Pharmacogenetics of drug metabolising enzymes: importance for personalised medicine. *Clinical chemistry and laboratory medicine: CCLM / FESCC* 41, 573–80 (2003).
 31. Transplantation in the treatment of Renal failure a *Harrison's Principles of Internal Medicine* (Mc Graw Hill, 2009).
 32. Traeger, J., Touraine, J. L., Malik, M. C., Revillar, J. P. & Laville, M. Antilymphocyte globulin and thoracic duct drainage in renal transplantation. *Kidney international. Supplement* S-74-81 (1983).
 33. Machleder, H. I. & Paulus, H. Maintenance of long-term thoracic duct fistulas for the achievement of immunosuppression in man. *Lymphology* 14, 77–80 (1981).
 34. Schreiber, S. L., Liu, J., Albers, M. W., Karmacharya, R., Koh, E., Martin, P. K., Rosen, M. K., Standaert, R. F. & Wandless, T. J. Immunophilin-ligand complexes as probes of intracellular signaling pathways. *Transplantation proceedings* 23, 2839–44 (1991).
 35. Galat, A. Peptidylproline cis-trans-isomerases: immunophilins. *European journal of biochemistry / FEBS* 216, 689–707 (1993).
 36. Bennett, W. M., DeMattos, A., Meyer, M. M., Andoh, T. & Barry, J. M. Chronic cyclosporine nephropathy in renal transplantation. *Transplantation proceedings* 28, 2100–3 (1996).
 37. Robinson, P. D., Shroff, R. C. & Spencer, H. Renal complications following lung and heart-lung transplantation. *Pediatric nephrology (Berlin, Germany)* 28, 375–86 (2012).
 38. Naesens, M., Kuypers, D. R. J. & Sarwal, M. Calcineurin inhibitor nephrotoxicity. *Clinical journal of the American Society of Nephrology: CJASN* 4, 481–508 (2009).

39. Collini, A., De Bartolomeis, C., Barni, R., Ruggieri, G., Bernini, M. & Carmellini, M. Calcineurin-inhibitor induced pain syndrome after organ transplantation. *Kidney international* 70, 1367–70 (2006).
40. Prommer, E. Calcineurin-inhibitor pain syndrome. *The Clinical journal of pain* 28, 556–9 (2012).
41. Zhang, W. & Victor, R. G. Calcineurin inhibitors cause renal afferent activation in rats: a novel mechanism of cyclosporine-induced hypertension. *American journal of hypertension* 13, 999–1004 (2000).
42. Pallet, N. & Legendre, C. Adverse events associated with mTOR inhibitors. *Expert opinion on drug safety* 12, 177–86 (2012).
43. Van den Hoogen, M. W. F. & Hilbrands, L. B. Use of monoclonal antibodies in renal transplantation. *Immunotherapy* 3, 871–80 (2011).
44. Ramanath, V., Nistala, R. & Chaudhary, K. Update on the role of rituximab in kidney diseases and transplant. *Expert opinion on biological therapy* 12, 223–33 (2012).
45. Cruzado, J. M. & Grinyó, J. Terapéutica inmunosupresora a *Nefrología Clínica* 896–907 (Editorial Médica Panamericana, S.A., 2003).
46. Van den Hoogen, M. & Hilbrands, L. Reduced exposure to calcineurin inhibitors in renal transplantation. *The New England journal of medicine* 358, 2519; author reply 2519–20 (2008).
47. Pallardó, L. M. Complicaciones a largo plazo del trasplante renal a *Nefrología Clínica* 910–925 (Editorial Médica Panamericana, S.A., 2003).
48. Paul, L. Chronic allograft nephropathy: an update. *Kidney international* 56, 783–793 (1999).
49. Serón, D., Arns, W. & Chapman, J. R. Chronic allograft nephropathy--clinical guidance for early detection and early intervention strategies. *Nephrology, dialysis, transplantation: official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 23, 2467–73 (2008).
50. Nankivell, B. J., Borrows, R. J., Fung, C. L.-S., O'Connell, P. J., Allen, R. D. M. & Chapman, J. R. The natural history of chronic allograft nephropathy. *The New England journal of medicine* 349, 2326–33 (2003).
51. Kriz, W. & LeHir, M. Pathways to nephron loss starting from glomerular diseases-insights from animal models. *Kidney International* 67, 404–419 (2005).

52. Boots, J. M. M. Calcineurin-based immunosuppression in renal transplantation: focus on efficacy, the role of steroids, and the cardiovascular risk. (2006). <<http://www.narcis.nl/publication/RecordID/oai:dare:8867>>
53. De Mattos, A. M., Olyaei, A. J. & Bennett, W. M. Nephrotoxicity of immunosuppressive drugs: long-term consequences and challenges for the future. *American journal of kidney diseases*: the official journal of the National Kidney Foundation 35, 333–46 (2000).
54. Salahudeen, A. K., Haider, N. & May, W. Cold ischemia and the reduced long-term survival of cadaveric renal allografts. *Kidney international* 65, 713–8 (2004).
55. Solez, K. & Racusen, L. C. The Banff classification revisited. *Kidney international* 83, 201–6 (2012).
56. Mengel, M., Sis, B., Haas, M., Colvin, R. B., Halloran, P. F., Racusen, L. C., Solez, K., Cendales, L., Demetris, A. J., Drachenberg, C. B., Farver, C. F., Rodriguez, E. R., Wallace, W. D. & Glotz, D. Banff 2011 Meeting report: new concepts in antibody-mediated rejection. *American journal of transplantation*: official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons 12, 563–70 (2012).
57. Sis, B. *et al.* Banff '09 meeting report: antibody mediated graft deterioration and implementation of Banff working groups. *American journal of transplantation: official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 10, 464–71 (2010).
58. Malyszko, J., Durlik, M. & Przybylowski, P. Kidney dysfunction after non renal solid organ transplantation. *Annals of transplantation: quarterly of the Polish Transplantation Society* 14, 71–79 (2009).
59. Schwarz, A., Haller, H., Schmitt, R., Schiffer, M., Koenecke, C., Strassburg, C., Lehner, F., Gottlieb, J., Bara, C., Becker, J. U. & Broecker, V. Biopsy-diagnosed renal disease in patients after transplantation of other organs and tissues. *American journal of transplantation: official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 10, 2017–25 (2010).
60. Chiurciu, C. & Remuzzi, G. II. Síndrome hemolítico urémico. Microangiopatía trombótica. *Nefrología XXIII*, 13–20 (2003).
61. University of Pittsburg Medical centre (UPMC). Transplant Pathology Internet Services (TPIS). *Kidney* (2009). a <<http://tpis1.upmc.com:81/tpis/kidney/index.html>>

62. National kidney Foundation. Atlas of Renal Pathology. *American journal of kidney diseases: the official journal of the National Kidney Foundation* (2001). a <<http://www.ajkd.org/webfiles/images/journals/yajkd/atlasterms.htm>>
63. Ferrario, F. & Rastaldi, M. Histopathological Atlas of Renal Diseases. *Fondazione D'Amico per la ricerca sulle malattie renali* a <http://www.fondazionedamico.org/biopsiarenale_atlas/trap/ciclotacro/morfologia.htm>
64. Sigal, N. H., Dumont, F., Durette, P., Siekierka, J. J., Peterson, L., Rich, D. H., Dunlap, B. E., Staruch, M. J., Melino, M. R. & Koprak, S. L. Is cyclophilin involved in the immunosuppressive and nephrotoxic mechanism of action of cyclosporin A? *The Journal of experimental medicine* 173, 619–28 (1991).
65. Göthel, S. F. & Marahiel, M. A. Peptidyl-prolyl cis-trans isomerases, a superfamily of ubiquitous folding catalysts. *Cellular and molecular life sciences: CMLS* 55, 423–36 (1999).
66. Wolf, I. M., Periyasamy, S., Hinds, T., Yong, W., Shou, W. & Sanchez, E. R. Targeted ablation reveals a novel role of FKBP52 in gene-specific regulation of glucocorticoid receptor transcriptional activity. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 113, 36–45 (2009).
67. Hocherl, K. Cyclosporine A Suppresses Cyclooxygenase-2 Expression in the Rat Kidney. *Journal of the American Society of Nephrology* 13, 2427–2436 (2002).
68. Ponticelli, C. De novo thrombotic microangiopathy. An underrated complication of renal transplantation. *Clinical nephrology* 67, 335–40 (2007).
69. Naesens, M., Kambham, N., Concepcion, W., Salvatierra, O. & Sarwal, M. The evolution of nonimmune histological injury and its clinical relevance in adult-sized kidney grafts in pediatric recipients. *American journal of transplantation: official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 7, 2504–14 (2007).
70. Matas, A. J. Chronic progressive calcineurin nephrotoxicity: an overstated concept. *American journal of transplantation: official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 11, 687–92 (2011).
71. Chapman, J. R. Chronic calcineurin inhibitor nephrotoxicity-lest we forget. *American journal of transplantation: official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 11, 693–7 (2011).
72. Chapman, J. R. Chronic calcineurin inhibitor use is nephrotoxic. *Clinical pharmacology and therapeutics* 90, 207–9 (2011).

73. Mengel, M., Mihatsch, M. & Halloran, P. F. Histological characteristics of calcineurin inhibitor toxicity--there is no such thing as specificity! *American journal of transplantation: official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 11, 2549–50 (2011).
74. Bröcker, V., Schubert, V., Scheffner, I., Schwarz, A., Hiss, M., Becker, J. U., Scherer, R., Haller, H., Kreipe, H. H., Mengel, M. & Gwinner, W. Arteriolar lesions in renal transplant biopsies: prevalence, progression, and clinical significance. *The American journal of pathology* 180, 1852–62 (2012).
75. Collins, B. S., Davis, C. L., Marsh, C. L., McVicar, J. P., Perkins, J. D. & Alpers, C. E. Reversible cyclosporine arteriopathy. *Transplantation* 54, 732–4 (1992).
76. Morozumi, K., Thiel, G., Albert, F. W., Banfi, G., Gudat, F. & Mihatsch, M. J. Studies on morphological outcome of cyclosporine-associated arteriopathy after discontinuation of cyclosporine in renal allografts. *Clinical nephrology* 38, 1–8 (1992).
77. Young, B. A., Burdmann, E. A., Johnson, R. J., Andoh, T., Bennett, W. M., Couser, W. G. & Alpers, C. E. Cyclosporine A induced arteriopathy in a rat model of chronic cyclosporine nephropathy. *Kidney international* 48, 431–8 (1995).
78. Hill-Eubanks, D. C., Gomez, M. F., Stevenson, A. S. & Nelson, M. T. NFAT regulation in smooth muscle. *Trends in cardiovascular medicine* 13, 56–62 (2003).
79. Parra Cid, T., Conejo García, J. R., Carballo Alvarez, F. & de Arriba, G. Antioxidant nutrients protect against cyclosporine A nephrotoxicity. *Toxicology* 189, 99–111 (2003).
80. De Arriba, G., de Hornedo, J. P., Rubio, S. R., Fernández, M. C., Martínez, S. B., Camarero, M. M. & Cid, T. P. Vitamin E protects against the mitochondrial damage caused by cyclosporin A in LLC-PK1 cells. *Toxicology and applied pharmacology* 239, 241–50 (2009).
81. Andrés, D., Bautista, M. & Cascales, M. Attenuation of cyclosporine A toxicity by sublethal heat shock. Role of catalase. *Biochemical pharmacology* 69, 493–501 (2005).
82. Khanna, A., Plummer, M., Bromberek, C., Bresnahan, B. & Hariharan, S. Expression of TGF-beta and fibrogenic genes in transplant recipients with tacrolimus and cyclosporine nephrotoxicity. *Kidney international* 62, 2257–63 (2002).
83. Gewin, L. & Zent, R. How does TGF- β mediate tubulointerstitial fibrosis? *Seminars in nephrology* 32, 228–35 (2012).

84. Farris, A. B. & Colvin, R. B. Renal interstitial fibrosis: mechanisms and evaluation. *Current opinion in nephrology and hypertension* 21, 289–300 (2012).
85. Iwano, M. EMT and TGF-beta in renal fibrosis. *Frontiers in bioscience (Scholar edition)* 2, 229–38 (2010).
86. Kalluri, R. EMT: when epithelial cells decide to become mesenchymal-like cells. *The Journal of clinical investigation* 119, 1417–9 (2009).
87. Carew, R. M., Wang, B. & Kantharidis, P. The role of EMT in renal fibrosis. *Cell and tissue research* 347, 103–16 (2012).
88. Grgic, I., Duffield, J. S. & Humphreys, B. D. The origin of interstitial myofibroblasts in chronic kidney disease. *Pediatric nephrology (Berlin, Germany)* 27, 183–93 (2012).
89. Puigmulé, M., López-Hellin, J., Suñé, G., Tornavaca, O., Camaño, S., Tejedor, A. & Meseguer, A. Differential proteomic analysis of cyclosporine A-induced toxicity in renal proximal tubule cells. *Nephrology, dialysis, transplantation* □: official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association 24, 2672–86 (2009).
90. Xiao, Z., Li, C., Shan, J., Luo, L., Feng, L., Lu, J., Li, S., Long, D. & Li, Y. Mechanisms of renal cell apoptosis induced by cyclosporine A: a systematic review of in vitro studies. *American journal of nephrology* 33, 558–66 (2011).
91. Ito, H., Kasagi, N., Shomori, K., Osaki, M. & Adachi, H. Apoptosis in the human allografted kidney. Analysis by terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated DUTP-biotin nick end labeling. *Transplantation* 60, 794–8 (1995).
92. Lally, C., Healy, E. & Ryan, M. P. Cyclosporine A-induced cell cycle arrest and cell death in renal epithelial cells. *Kidney international* 56, 1254–7 (1999).
93. Pallet, N., Rabant, M., Xu-Dubois, Y.-C., Lecorre, D., Mucchielli, M.-H., Imbeaud, S., Agier, N., Hertig, A., Thervet, E., Legendre, C., Beaune, P. & Anglicheau, D. Response of human renal tubular cells to cyclosporine and sirolimus: a toxicogenomic study. *Toxicology and applied pharmacology* 229, 184–96 (2008).
94. Suñé, G., Sarró, E., Puigmulé, M., López-Hellín, J., Zufferey, M., Pertel, T., Luban, J. & Meseguer, A. Cyclophilin B interacts with sodium-potassium ATPase and is required for pump activity in proximal tubule cells of the kidney. *PLoS one* 5, e13930 (2010).
95. Sarró, E., Jacobs-Cachá, C., Itarte, E. & Meseguer, A. A pharmacologically-based array to identify targets of cyclosporine A-induced toxicity in cultured

- renal proximal tubule cells. *Toxicology and applied pharmacology* 258, 275–87 (2012).
96. Charuk, J. H., Wong, P. Y. & Reithmeier, R. A. Differential interaction of human renal P-glycoprotein with various metabolites and analogues of cyclosporin A. *The American journal of physiology* 269, F31–9 (1995).
 97. Kambham, N., Nagarajan, S., Shah, S., Li, L., Salvatierra, O. & Sarwal, M. M. A novel, semiquantitative, clinically correlated calcineurin inhibitor toxicity score for renal allograft biopsies. *Clinical journal of the American Society of Nephrology: CJASN* 2, 135–42 (2007).
 98. Pallet, N., Djamali, A. & Legendre, C. Challenges in diagnosing acute calcineurin-inhibitor induced nephrotoxicity: from toxicogenomics to emerging biomarkers. *Pharmacological research: the official journal of the Italian Pharmacological Society* 64, 25–30 (2011).
 99. Österholm, C., Veress, B., Simanaitis, M., Hedner, U. & Ekberg, H. Differential expression of tissue factor (TF) in calcineurin inhibitor-induced nephrotoxicity and rejection--implications for development of a possible diagnostic marker. *Transplant immunology* 15, 165–72 (2005).
 100. Cui, Y., Huang, Q., Auman, J. T., Knight, B., Jin, X., Blanchard, K. T., Chou, J., Jayadev, S. & Paules, R. S. Genomic-derived markers for early detection of calcineurin inhibitor immunosuppressant-mediated nephrotoxicity. *Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology* 124, 23–34 (2011).
 101. Ferguson, M. a & Waikar, S. S. Established and emerging markers of kidney function. *Clinical chemistry* 58, 680–9 (2012).
 102. Martín Govantes, J. & Sánchez Moreno, A. Proteinuria. *Asociación Española de Pediatría Protocolos*, (2008).
 103. Gorriz, J. L. & Martinez-Castelao, A. Proteinuria: detection and role in native renal disease progression. *Transplantation reviews (Orlando, Fla.)* 26, 3–13 (2012).
 104. Doi, K., Katagiri, D., Negishi, K., Hasegawa, S., Hamasaki, Y., Fujita, T., Matsubara, T., Ishii, T., Yahagi, N., Sugaya, T. & Noiri, E. Mild elevation of urinary biomarkers in prerenal acute kidney injury. *Kidney international* 82, 1114–20 (2012).
 105. Halawa, A. The early diagnosis of acute renal graft dysfunction: a challenge we face. The role of novel biomarkers. *Annals of transplantation: quarterly of the Polish Transplantation Society* 16, 90–8 (2011).
 106. Bonventre, J. V. Kidney injury molecule-1 (KIM-1): a urinary biomarker and much more. *Nephrology, dialysis, transplantation: official publication of the*

- European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 24, 3265–8 (2009).
107. Cuadros, T., Trilla, E., Vilà, M. R., de Torres, I., Vilardell, J., Messaoud, N. Ben, Salcedo, M., Sarró, E., López-Hellin, J., Blanco, A., Mir, C., Ramón Y Cajal, S., Itarte, E., Morote, J. & Meseguer, A. Hepatitis A virus cellular receptor 1/kidney injury molecule-1 is a susceptibility gene for clear cell renal cell carcinoma and hepatitis A virus cellular receptor/kidney injury molecule-1 ectodomain shedding a predictive biomarker of tumour progression. *European journal of cancer (Oxford, England: 1990)* 49, 2034–47 (2013).
 108. Choi, H. M., Park, K. T., Lee, J. W., Cho, E., Jo, S. K., Cho, W. Y. & Kim, H. K. Urine Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin Predicts Graft Outcome up to 1 Year After Kidney Transplantation. *Transplantation proceedings* 45, 122–8 (2013).
 109. Kaufeld, J. K., Gwinner, W., Scheffner, I., Haller, H. G. & Schiffer, M. Urinary NGAL Ratio Is Not a Sensitive Biomarker for Monitoring Acute Tubular Injury in Kidney Transplant Patients: NGAL and ATI in Renal Transplant Patients. *Journal of transplantation* 2012, 563404 (2012).
 110. Wasilewska, A., Zoch-Zwierz, W., Taranta-Janusz, K. & Michaluk-Skutnik, J. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL): a new marker of cyclosporine nephrotoxicity? *Pediatric nephrology (Berlin, Germany)* 25, 889–97 (2010).
 111. Sirota, J. C., Walcher, A., Faubel, S., Jani, A., McFann, K., Devarajan, P., Davis, C. L. & Edelstein, C. L. Urine IL-18, NGAL, IL-8 and serum IL-8 are biomarkers of acute kidney injury following liver transplantation. *BMC nephrology* 14, 17 (2013).
 112. Marchewka, Z., Kuźniar, J. & Długosz, A. Enzymatic markers of cyclosporine nephrotoxicity in patients after renal transplantation. *International urology and nephrology* 31, 727–34 (1999).
 113. Marchewka, Z., Kuźniar, J., Zynek-Litwin, M., Falkiewicz, K., Szymańska, B., Roszkowska, A. & Klinger, M. Kidney graft function in long-term cyclosporine and tacrolimus treatment: comparative study with nephrotoxicity markers. *Transplantation proceedings* 41, 1660–5 (2009).
 114. Parikh, C. R., Jani, A., Melnikov, V. Y., Faubel, S. & Edelstein, C. L. Urinary interleukin-18 is a marker of human acute tubular necrosis. *American journal of kidney diseases*: the official journal of the National Kidney Foundation 43, 405–14 (2004).
 115. Pelsers, M. M. A. L. Fatty acid-binding protein as marker for renal injury. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation. Supplementum* 241, 73–7 (2008).

116. Przybylowski, P., Koc-Zorawska, E., Malyszko, J. S., Kozłowska, S., Mysliwiec, M. & Malyszko, J. Liver fatty-acid-binding protein in heart and kidney allograft recipients in relation to kidney function. *Transplantation proceedings* 43, 3064–7 (2011).
117. Wishart, D. S. Metabolomics: a complementary tool in renal transplantation. *Contributions to nephrology* 160, 76–87 (2008).
118. Wishart, D. S. Metabolomics in monitoring kidney transplants. *Current opinion in nephrology and hypertension* 15, 637–42 (2006).
119. Lorenzen, J. M. & Thum, T. Circulating and urinary microRNAs in kidney disease. *Clinical journal of the American Society of Nephrology: CJASN* 7, 1528–33 (2012).
120. Lorenzen, J. M., Kielstein, J. T., Hafer, C., Gupta, S. K., Kämpers, P., Faulhaber-Walter, R., Haller, H., Fliser, D. & Thum, T. Circulating miR-210 predicts survival in critically ill patients with acute kidney injury. *Clinical journal of the American Society of Nephrology: CJASN* 6, 1540–6 (2011).
121. Lorenzen, J. M., Volkmann, I., Fiedler, J., Schmidt, M., Scheffner, I., Haller, H., Gwinner, W. & Thum, T. Urinary miR-210 as a mediator of acute T-cell mediated rejection in renal allograft recipients. *American journal of transplantation*: official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons 11, 2221–7 (2011).
122. Wang, G., Kwan, B. C.-H., Lai, F. M.-M., Chow, K.-M., Li, P. K.-T. & Szeto, C.-C. Urinary miR-21, miR-29, and miR-93: novel biomarkers of fibrosis. *American journal of nephrology* 36, 412–8 (2012).
123. Khella, H. W. Z., Bakhet, M., Lichner, Z., Romaschin, A. D., Jewett, M. A. S. & Yousef, G. M. MicroRNAs in Kidney Disease: An Emerging Understanding. *American journal of kidney diseases: the official journal of the National Kidney Foundation* 61, 798–808 (2012).
124. Gomez-Alamillo, C., Ramos-Barron, M. A., Benito-Hernandez, A., Rodrigo, E., Ruiz, J. C., Agüeros, C., Sanchez, M. & Arias, M. Relation of urinary gene expression of epithelial-mesenchymal transition markers with initial events and 1-year kidney graft function. *Transplantation proceedings* 44, 2573–6 (2012).
125. Szeto, C.-C., Ching-Ha, K. B., Ka-Bik, L., Mac-Moune, L. F., Cheung-Lung, C. P., Gang, W., Kai-Ming, C. & Kam-Tao, L. P. Micro-RNA expression in the urinary sediment of patients with chronic kidney diseases. *Disease markers* 33, 137–44 (2012).
126. Keller, S., Sanderson, M. P., Stoeck, A. & Altevogt, P. Exosomes: from biogenesis and secretion to biological function. *Immunology letters* 107, 102–8 (2006).

127. György, B., Szabó, T. G., Pásztói, M., Pál, Z., Misják, P., Aradi, B., László, V., Pállinger, E., Pap, E., Kittel, A., Nagy, G., Falus, A. & Buzás, E. I. Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cellular and molecular life sciences: CMLS* 68, 2667–88 (2011).
128. Fleissner, F., Goerzig, Y., Haverich, A. & Thum, T. Microvesicles as novel biomarkers and therapeutic targets in transplantation medicine. *American journal of transplantation: official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 12, 289–97 (2012).
129. Pisitkun, T., Shen, R.-F. & Knepper, M. A. Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 13368–73 (2004).
130. Pisitkun, T., Gandolfo, M. T., Das, S., Knepper, M. A. & Bagnasco, S. M. Application of systems biology principles to protein biomarker discovery: urinary exosomal proteome in renal transplantation. *Proteomics. Clinical applications* 6, 268–78 (2012).
131. Dear, J. W., Street, J. M. & Bailey, M. A. Urinary exosomes: A reservoir for biomarker discovery and potential mediators of intrarenal signalling. *Proteomics* 13, 1572–80 (2013).
132. Van Balkom, B. W. M., Pisitkun, T., Verhaar, M. C. & Knepper, M. A. Exosomes and the kidney: prospects for diagnosis and therapy of renal diseases. *Kidney international* 80, 1138–45 (2011).
133. Christians, U., Klawitter, J., Klawitter, J., Brunner, N. & Schmitz, V. Biomarkers of immunosuppressant organ toxicity after transplantation: status, concepts and misconceptions. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology* 7, 175–200 (2011).
134. Wu, Y., Connors, D., Barber, L., Jayachandra, S., Hanumegowda, U. M. & Adams, S. P. Multiplexed assay panel of cytotoxicity in HK-2 cells for detection of renal proximal tubule injury potential of compounds. *Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA* 23, 1170–8 (2009).
135. Ryan, M. J., Johnson, G., Kirk, J., Fuerstenberg, S. M., Zager, R. A. & Torok-Storb, B. HK-2: an immortalized proximal tubule epithelial cell line from normal adult human kidney. *Kidney international* 45, 48–57 (1994).
136. Schägger, H. Tricine-SDS-PAGE. *Nature protocols* 1, 16–22 (2006).
137. Candiano, G., Bruschi, M., Musante, L., Santucci, L., Ghiggeri, G. M., Carnemolla, B., Orecchia, P., Zardi, L. & Righetti, P. G. Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis* 25, 1327–33 (2004).

138. Blass, K. G., Thibert, R. J. & Lam, L. K. A study of the mechanism of the Jaffé reaction. *Zeitschrift für klinische Chemie und klinische Biochemie* 12, 336–43 (1974).
139. Jeon, S.-H., Park, H.-M., Kim, S.-J., Lee, M.-Y., Kim, G.-B., Rahman, M. M., Woo, J.-N., Kim, I.-S., Kim, J.-S. & Kang, H.-S. Taurine reduces FK506-induced generation of ROS and activation of JNK and Bax in Madin Darby canine kidney cells. *Human & experimental toxicology* 29, 627–33 (2010).
140. Moutabarrik, A., Ishibashi, M., Kameoka, H., Kawaguchi, N., Takano, Y., Kokado, Y., Onishi, S., Sonoda, T., Takahara, S. & Okuyama, A. In vitro FK506 kidney tubular cell toxicity. *Transplant international: official journal of the European Society for Organ Transplantation* 5 Suppl 1, S87–92 (1992).
141. Atcherson, M. M. & Trifillis, A. L. Cytotoxic effects of FK506 on human renal proximal tubule cells in culture. *In vitro cellular & developmental biology. Animal* 30A, 562–7 (1994).
142. Kawasaki, Y., Harashima, S., Sasaki, M., Mukai, E., Nakamura, Y., Harada, N., Toyoda, K., Hamasaki, A., Yamane, S., Yamada, C., Yamada, Y., Seino, Y. & Inagaki, N. Exendin-4 protects pancreatic beta cells from the cytotoxic effect of rapamycin by inhibiting JNK and p38 phosphorylation. *Hormone and metabolic research* 42, 311–7 (2010).
143. Smith, M. A. & Schnellmann, R. G. Calpains, mitochondria, and apoptosis. *Cardiovascular research* 96, 32–7 (2012).
144. Melov, S. Mitochondrial oxidative stress. Physiologic consequences and potential for a role in aging. *Annals of the New York Academy of Sciences* 908, 219–25 (2000).
145. Iwaki, T., Urano, T. & Umemura, K. PAI-1, progress in understanding the clinical problem and its aetiology. *British journal of haematology* 157, 291–8 (2012).
146. Eddy, A. A. Plasminogen activator inhibitor-1 and the kidney. *American journal of physiology. Renal physiology* 283, F209–20 (2002).
147. Eddy, A. A. Serine proteases, inhibitors and receptors in renal fibrosis. *Thrombosis and haemostasis* 101, 656–64 (2009).
148. Chang, H.-R., Yang, S.-F., Lian, J.-D., Lin, C.-C., Wen, M.-C., Chen, Y. T., Jan, Y.-J. & Hsieh, Y.-S. Prediction of chronic allograft damage index of renal allografts using serum level of plasminogen activator inhibitor-1. *Clinical transplantation* 23, 206–12 (2009).

149. Perkowska, A., Elhasade, A., Gaciong, Z., Durlik, M., Placha, G., Galazka, Z. & Lao, M. Regulators of fibrynolysis in plasma of kidney transplant recipients. *Transplantation proceedings* 34, 585–8 (2002).
150. Yamashiro, S., Yamakita, Y., Ono, S. & Matsumura, F. Fascin, an actin-bundling protein, induces membrane protrusions and increases cell motility of epithelial cells. *Molecular biology of the cell* 9, 993–1006 (1998).
151. Adams, J. C. Roles of fascin in cell adhesion and motility. *Current opinion in cell biology* 16, 590–6 (2004).
152. Xing, P., Li, J., Jin, F., Zhao, T., Liu, Q., Dong, H. & Wei, X. Fascin, an actin-bundling protein, promotes breast cancer progression in vitro. *Cell biochemistry and function* 29, 303–10 (2011).
153. Sarrió, D., Rodriguez-Pinilla, S. M., Hardisson, D., Cano, A., Moreno-Bueno, G. & Palacios, J. Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer relates to the basal-like phenotype. *Cancer research* 68, 989–97 (2008).
154. Chen, L., Yang, S., Jakoncic, J., Zhang, J. J. & Huang, X.-Y. Migrastatin analogues target fascin to block tumour metastasis. *Nature* 464, 1062–6 (2010).
155. Lamoureux, F., Mestre, E., Essig, M., Sauvage, F. L., Marquet, P. & Gastinel, L. N. Quantitative proteomic analysis of cyclosporine-induced toxicity in a human kidney cell line and comparison with tacrolimus. *Journal of proteomics* 75, 677–94 (2011).
156. Denys, A., Allain, F., Masy, E., Dessaint, J. P. & Spik, G. Enhancing the effect of secreted cyclophilin B on immunosuppressive activity of cyclosporine. *Transplantation* 65, 1076–84 (1998).
157. Waikar, S. S., Sabbiseti, V. S. & Bonventre, J. V. Normalization of urinary biomarkers to creatinine during changes in glomerular filtration rate. *Kidney international* 78, 486–94 (2010).
158. Dowling, P. & Clynes, M. Conditioned media from cell lines: a complementary model to clinical specimens for the discovery of disease-specific biomarkers. *Proteomics* 11, 794–804 (2011).
159. Ween, M. P., Lokman, N. A., Hoffmann, P., Rodgers, R. J., Ricciardelli, C. & Oehler, M. K. Transforming growth factor-beta-induced protein secreted by peritoneal cells increases the metastatic potential of ovarian cancer cells. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 128, 1570–84 (2011).
160. Zhong, L., Roybal, J., Chaerkady, R., Zhang, W., Choi, K., Alvarez, C. A., Tran, H., Creighton, C. J., Yan, S., Strieter, R. M., Pandey, A. & Kurie, J. M.

- Identification of secreted proteins that mediate cell-cell interactions in an in vitro model of the lung cancer microenvironment. *Cancer research* 68, 7237–45 (2008).
161. Wu, H.-Y., Chang, Y.-H., Chang, Y.-C. & Liao, P.-C. Proteomics analysis of nasopharyngeal carcinoma cell secretome using a hollow fiber culture system and mass spectrometry. *Journal of proteome research* 8, 380–9 (2009).
 162. Chang, Y.-H., Wu, C.-C., Chang, K.-P., Yu, J.-S., Chang, Y.-C. & Liao, P.-C. Cell secretome analysis using hollow fiber culture system leads to the discovery of CLIC1 protein as a novel plasma marker for nasopharyngeal carcinoma. *Journal of proteome research* 8, 5465–74 (2009).
 163. Haycock, J. W. 3D cell culture: a review of current approaches and techniques. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 695, 1–15 (2011).
 164. Mannello, F., Medda, V. & Tonti, G. A. Protein profile analysis of the breast microenvironment to differentiate healthy women from breast cancer patients. *Expert review of proteomics* 6, 43–60 (2009).
 165. Friedman, D. B., Hoving, S. & Westermeier, R. Isoelectric focusing and two-dimensional gel electrophoresis. *Methods in enzymology* 463, 515–40 (2009).
 166. Sarkissian, G., Fergelot, P., Lamy, P.-J., Patard, J.-J., Culine, S., Jouin, P., Rioux-Leclercq, N. & Darbouret, B. Identification of pro-MMP-7 as a serum marker for renal cell carcinoma by use of proteomic analysis. *Clinical chemistry* 54, 574–81 (2008).
 167. Lamoureux, F., Gastinel, L. N., Mestre, E., Marquet, P. & Essig, M. Mapping cyclosporine-induced changes in protein secretion by renal cells using stable isotope labeling with amino acids in cell culture (SILAC). *Journal of Proteomics* 75, 3674–3687 (2012).
 168. Price, E. R., Jin, M., Lim, D., Pati, S., Walsh, C. T. & McKeon, F. D. Cyclophilin B trafficking through the secretory pathway is altered by binding of cyclosporin A. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 3931–5 (1994).
 169. De Ceuninck, F., Allain, F., Caliez, A., Spik, G. & Vanhoutte, P. M. High binding capacity of cyclophilin B to chondrocyte heparan sulfate proteoglycans and its release from the cell surface by matrix metalloproteinases: possible role as a proinflammatory mediator in arthritis. *Arthritis and rheumatism* 48, 2197–206 (2003).
 170. Fearon, P., Lonsdale-Eccles, A. A., Ross, O. K., Todd, C., Sinha, A., Allain, F. & Reynolds, N. J. Keratinocyte secretion of cyclophilin B via the constitutive pathway is regulated through its cyclosporin-binding site. *The Journal of investigative dermatology* 131, 1085–94 (2011).

171. Allain, F., Boutillon, C., Mariller, C. & Spik, G. Selective assay for CyPA and CyPB in human blood using highly specific anti-peptide antibodies. *Journal of immunological methods* 178, 113–20 (1995).
172. Mariller, C., Allain, F., Kouach, M. & Spik, G. Evidence that human milk isolated cyclophilin B corresponds to a truncated form. *Biochimica et biophysica acta* 1293, 31–8 (1996).
173. Allain, F., Denys, A. & Spik, G. Cyclophilin B mediates cyclosporin A incorporation in human blood T-lymphocytes through the specific binding of complexed drug to the cell surface. *The Biochemical journal* 317 (Pt 2, 565–70 (1996).
174. Lee, W.-K. & Thévenod, F. Novel roles for ceramides, calpains and caspases in kidney proximal tubule cell apoptosis: lessons from in vitro cadmium toxicity studies. *Biochemical pharmacology* 76, 1323–32 (2008).
175. Declerck, P. J. & Gils, A. Three Decades of Research on Plasminogen Activator Inhibitor-1: A Multifaceted Serpin. *Seminars in thrombosis and hemostasis* 1, 356–364 (2013).
176. Schäfer, M. & Werner, S. Cancer as an overheating wound: an old hypothesis revisited. *Nature reviews. Molecular cell biology* 9, 628–38 (2008).
177. Kruithof, E. K. O. Regulation of plasminogen activator inhibitor type 1 gene expression by inflammatory mediators and statins. *Thrombosis and haemostasis* 100, 969–75 (2008).
178. Di Lorenzo, C., Dell'agli, M., Colombo, E., Sangiovanni, E. & Restani, P. Metabolic syndrome and inflammation: a critical review of in vitro and clinical approaches for benefit assessment of plant food supplements. *Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM* 2013, 782461 (2013).
179. Małgorzewicz, S., Skrzypczak-Jankun, E. & Jankun, J. Plasminogen activator inhibitor-1 in kidney pathology (Review). *International journal of molecular medicine* 31, 503–10 (2013).
180. Eddy, A. A. & Fogo, A. B. Plasminogen activator inhibitor-1 in chronic kidney disease: evidence and mechanisms of action. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN* 17, 2999–3012 (2006).
181. Revelo, M. P., Federspiel, C., Helderman, H. & Fogo, A. B. Chronic allograft nephropathy: expression and localization of PAI-1 and PPAR-gamma. *Nephrology, dialysis, transplantation: official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 20, 2812–9 (2005).

182. Elhasade, A. S., Perkowska, A., Paczek, L., Rowiński, W., Soluch, L., Szmidt, J., Gałazka, Z. & Gaciong, Z. The effect of cyclosporine on regulators of fibrinolysis in plasma from renal allograft recipients. *Annals of transplantation* □: *quarterly of the Polish Transplantation Society* 3, 13–8 (1998).
183. Duymelinck, C., Dauwe, S. E., Nouwen, E. J., De Broe, M. E. & Verpooten, G. A. Cholesterol feeding accentuates the cyclosporine-induced elevation of renal plasminogen activator inhibitor type 1. *Kidney international* 51, 1818–30 (1997).
184. Islam, M., Burke, J. F., McGowan, T. A., Zhu, Y., Dunn, S. R., McCue, P., Kanalas, J. & Sharma, K. Effect of anti-transforming growth factor-beta antibodies in cyclosporine-induced renal dysfunction. *Kidney international* 59, 498–506 (2001).
185. Shihab, F. S., Bennett, W. M., Tanner, A. M. & Andoh, T. F. Mechanism of fibrosis in experimental tacrolimus nephrotoxicity. *Transplantation* 64, 1829–37 (1997).
186. Dennler, S., Itoh, S., Vivien, D., ten Dijke, P., Huet, S. & Gauthier, J. M. Direct binding of Smad3 and Smad4 to critical TGF beta-inducible elements in the promoter of human plasminogen activator inhibitor-type 1 gene. *The EMBO journal* 17, 3091–100 (1998).
187. Pontrelli, P., Rossini, M., Infante, B., Stallone, G., Schena, A., Loverre, A., Ursi, M., Verrienti, R., Maiorano, A., Zaza, G., Ranieri, E., Gesualdo, L., Ditunno, P., Bettocchi, C., Schena, F. P. & Grandaliano, G. Rapamycin inhibits PAI-1 expression and reduces interstitial fibrosis and glomerulosclerosis in chronic allograft nephropathy. *Transplantation* 85, 125–34 (2008).
188. Doroszewski, W., Włodarczyk, Z., Stróżecki, P., Manitus, J., Grabarczyk, E., Rość, D. & Odrowaz-Sypniewska, G. Assessment of plasminogen activator inhibitor-1 and von Willebrand factor as a markers of endothelial function in patients with end-stage kidney disease after allotransplantation during a one-year follow-up. *Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej* 117, 213–20 (2007).
189. Ishikawa, A., Ohta, N., Ozono, S., Kawabe, K. & Kitamura, T. Inhibition of plasminogen activator inhibitor-1 by angiotensin II receptor blockers on cyclosporine-treated renal allograft recipients. *Transplantation proceedings* 37, 994–6 (2005).
190. Bertoni, E., Marcucci, R., Zanazzi, M., Rosati, A., Brunelli, T., Fedi, S., Pepe, G., Di Maria, L., Colonna, F. M., Lombardi, A., Abbate, R. & Salvadori, M. Hyperhomocysteinemia in renal transplant patients: an independent factor of cardiovascular disease. *Journal of nephrology* 14, 36–42 (2001).

191. Dellas, C. & Loskutoff, D. J. Historical analysis of PAI-1 from its discovery to its potential role in cell motility and disease. *Thrombosis and haemostasis* 93, 631–40 (2005).
192. Sartori, M. T., Rigotti, P., Marchini, F., Spiezia, L., Baldan, N., Furian, L., Varvarikis, C. & Girolami, A. Plasma fibrinolytic capacity in renal transplant recipients: effect of steroid-free immunosuppression therapy. *Transplantation* 75, 994–8 (2003).
193. Opatrný, K., Zemanová, P., Opatrná, S. & Vít, L. Fibrinolysis in chronic renal failure, dialysis and renal transplantation. *Annals of transplantation □: quarterly of the Polish Transplantation Society* 7, 34–43 (2002).
194. Becker, M., Szarvas, T., Wittschier, M., vom Dorp, F., Tötsch, M., Schmid, K. W., Rübber, H. & Ergün, S. Prognostic impact of plasminogen activator inhibitor type 1 expression in bladder cancer. *Cancer* 116, 4502–12 (2010).
195. Adams, J. C. Fascin protrusions in cell interactions. *Trends in cardiovascular medicine* 14, 221–6 (2004).
196. Jayo, A. & Parsons, M. Fascin: a key regulator of cytoskeletal dynamics. *The international journal of biochemistry & cell biology* 42, 1614–7 (2010).
197. Zhang, F.-R., Tao, L.-H., Shen, Z.-Y., Lv, Z., Xu, L.-Y. & Li, E.-M. Fascin expression in human embryonic, fetal, and normal adult tissue. *The journal of histochemistry and cytochemistry: official journal of the Histochemistry Society* 56, 193–9 (2008).
198. Hanker, L. C., Karn, T., Holtrich, U., Graeser, M., Becker, S., Reinhard, J., Ruckhäberle, E., Gevensleben, H. & Rody, A. Prognostic impact of fascin-1 (FSCN1) in epithelial ovarian cancer. *Anticancer research* 33, 371–7 (2013).
199. Kulasingam, V. & Diamandis, E. P. Fascin-1 is a novel biomarker of aggressiveness in some carcinomas. *BMC medicine* 11, 53 (2013).
200. Oh, S. Y., Kim, Y. B., Suh, K. W., Paek, O. J. & Moon, H. Y. Prognostic impact of fascin-1 expression is more significant in advanced colorectal cancer. *The Journal of surgical research* 172, 102–8 (2012).
201. Hayashi, Y., Osanai, M. & Lee, G.-H. Fascin-1 expression correlates with repression of E-cadherin expression in hepatocellular carcinoma cells and augments their invasiveness in combination with matrix metalloproteinases. *Cancer science* 102, 1228–35 (2011).
202. Qualtrough, D., Smallwood, K., Littlejohns, D. & Pignatelli, M. The actin-bundling protein fascin is overexpressed in inflammatory bowel disease and may be important in tissue repair. *BMC gastroenterology* 11, 14 (2011).

203. Xiao, T. *et al.* An approach to studying lung cancer-related proteins in human blood. *Molecular & cellular proteomics: MCP* 4, 1480–6 (2005).
204. Gonzales, P., Pisitkun, T. & Knepper, M. a. Urinary exosomes: is there a future? *Nephrology, dialysis, transplantation: official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 23, 1799–801 (2008).
205. Buschow, S. I., van Balkom, B. W. M., Aalberts, M., Heck, A. J. R., Wauben, M. & Stoorvogel, W. MHC class II-associated proteins in B-cell exosomes and potential functional implications for exosome biogenesis. *Immunology and cell biology* 88, 851–6 (2010).
206. Welton, J. L., Khanna, S., Giles, P. J., Brennan, P., Brewis, I. A., Staffurth, J., Mason, M. D. & Clayton, A. Proteomics analysis of bladder cancer exosomes. *Molecular & cellular proteomics: MCP* 9, 1324–38 (2010).
207. Hegmans, J. P. J. J., Bard, M. P. L., Hemmes, A., Luider, T. M., Kleijmeer, M. J., Prins, J.-B., Zitvogel, L., Burgers, S. A., Hoogsteden, H. C. & Lambrecht, B. N. Proteomic analysis of exosomes secreted by human mesothelioma cells. *The American journal of pathology* 164, 1807–15 (2004).
208. Sonderbye, L., Meehan, S., Palsson, R., Ahsan, N., Ladefoged, J. & Langhoff, E. Immunohistochemical study of actin binding protein (p55) in the human kidney. *Transplantation* 65, 1004–8 (1998).
209. Tsai, W.-C., Sheu, L.-F., Nieh, S., Yu, C.-P., Sun, G.-H., Lin, Y.-F., Chen, A. & Jin, J.-S. Association of EMMPRIN and fascin expression in renal cell carcinoma: correlation with clinicopathological parameters. *World journal of urology* 25, 73–80 (2007).
210. Craven, R. A., Stanley, A. J., Hanrahan, S., Dods, J., Unwin, R., Totty, N., Harnden, P., Eardley, I., Selby, P. J. & Banks, R. E. Proteomic analysis of primary cell lines identifies protein changes present in renal cell carcinoma. *Proteomics* 6, 2853–64 (2006).
211. Gun, B. D., Bahadir, B., Bektas, S., Barut, F., Yurdakan, G., Kandemir, N. O. & Ozdamar, S. O. Clinicopathological significance of fascin and CD44v6 expression in endometrioid carcinoma. *Diagnostic pathology* 7, 80 (2012).
212. Darnel, A. D., Behmoaram, E., Vollmer, R. T., Corcos, J., Bijian, K., Sircar, K., Su, J., Jiao, J., Alaoui-Jamali, M. A. & Bismar, T. A. Fascin regulates prostate cancer cell invasion and is associated with metastasis and biochemical failure in prostate cancer. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 15, 1376–83 (2009).

213. Bi, J., Chen, X., Zhang, Y., Li, B., Sun, J., Shen, H. & Kong, C. Fascin is a predictor for invasiveness and recurrence of urothelial carcinoma of bladder. *Urologic oncology* 30, 688–94 (2012).
214. Yamashiro, S. Functions of fascin in dendritic cells. *Critical reviews in immunology* 32, 11–21 (2012).
215. McMorrow, T., Gaffney, M. M., Slattery, C., Campbell, E. & Ryan, M. P. Cyclosporine A induced epithelial-mesenchymal transition in human renal proximal tubular epithelial cells. *Nephrology, dialysis, transplantation: official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 20, 2215–25 (2005).
216. Xu, Y., Wan, J., Jiang, D. & Wu, X. BMP-7 blocks the cyclosporine-A-induced epithelial-to-mesenchymal transition in renal tubular epithelial cells. *Nephron. Experimental nephrology* 114, e23–31 (2010).
217. Zhang, J., Fonovic, M., Suyama, K., Bogoy, M. & Scott, M. P. Rab35 controls actin bundling by recruiting fascin as an effector protein. *Science (New York, N.Y.)* 325, 1250–4 (2009).
218. Chua, C. E. L., Lim, Y. S. & Tang, B. L. Rab35--a vesicular traffic-regulating small GTPase with actin modulating roles. *FEBS letters* 584, 1–6 (2010).
219. Hsu, C., Morohashi, Y., Yoshimura, S.-I., Manrique-Hoyos, N., Jung, S., Lauterbach, M. a, Bakhti, M., Grønborg, M., Möbius, W., Rhee, J., Barr, F. a & Simons, M. Regulation of exosome secretion by Rab35 and its GTPase-activating proteins TBC1D10A-C. *The Journal of cell biology* 189, 223–32 (2010).
220. Choi, D.-S., Lee, J.-M., Park, G. W., Lim, H.-W., Bang, J. Y., Kim, Y.-K., Kwon, K.-H., Kwon, H. J., Kim, K. P. & Gho, Y. S. Proteomic analysis of microvesicles derived from human colorectal cancer cells. *Journal of proteome research* 6, 4646–55 (2007).
221. Mathivanan, S., Lim, J. W. E., Tauro, B. J., Ji, H., Moritz, R. L. & Simpson, R. J. Proteomics analysis of A33 immunoaffinity-purified exosomes released from the human colon tumor cell line LIM1215 reveals a tissue-specific protein signature. *Molecular & cellular proteomics: MCP* 9, 197–208 (2010).
222. Gonzales, P. A., Pisitkun, T., Hoffert, J. D., Tchapyjnikov, D., Star, R. A., Kleta, R., Wang, N. S. & Knepper, M. A. Large-scale proteomics and phosphoproteomics of urinary exosomes. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN* 20, 363–79 (2009).
223. Zheng, S., Zhong, Q., Jiang, Q., Mottamal, M., Zhang, Q., Zhu, N., Burow, M. E., Worthylake, R. A. & Wang, G. Discovery of a Series of Thiazole Derivatives

as Novel Inhibitors of Metastatic Cancer Cell Migration and Invasion. *ACS medicinal chemistry letters* 4, 191–196 (2013).

ANNEX



A pharmacologically-based array to identify targets of cyclosporine A-induced toxicity in cultured renal proximal tubule cells

Eduard Sarró^{a,b}, Conxita Jacobs-Cachá^b, Emilio Itarte^{a,*}, Anna Meseguer^{b,c,**},¹

^a Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Unitat de Bioquímica de Biociències, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra (Barcelona), Spain

^b Renal Physiopathology, CIBBIM-Nanomedicine, Vall d'Hebron Research Institute (VHIR), 08035 Barcelona, Spain

^c Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra (Barcelona), Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 September 2011

Revised 11 November 2011

Accepted 13 November 2011

Available online 3 December 2011

Keywords:

Cyclosporine A

Cytotoxicity

Pharmaceuticals

Array

Endoplasmic reticulum (ER) stress

ABSTRACT

Mechanisms of cyclosporine A (CsA)-induced nephrotoxicity were generally thought to be hemodynamic in origin; however, there is now accumulating evidence of a direct tubular effect. Although genomic and proteomic experiments by our group and others provided overall information on genes and proteins up- or down-regulated by CsA in proximal tubule cells (PTC), a comprehensive view of events occurring after CsA exposure remains to be described. For this purpose, we applied a pharmacologic approach based on the use of known activities of a large panel of potentially protective compounds and evaluated their efficacy in preventing CsA toxicity in cultured mouse PTC. Our results show that compounds that blocked protein synthesis and apoptosis, together with the CK2 inhibitor DMAT and the PI3K inhibitor apigenin, were the most efficient in preventing CsA toxicity. We also identified GSK3, MMPs and PKC pathways as potential targets to prevent CsA damage. Additionally, heparinase-I and MAPK inhibitors afforded partial but significant protection. Interestingly, antioxidants and calcium metabolism-related compounds were unable to ameliorate CsA-induced cytotoxicity. Subsequent experiments allowed us to clarify the hierarchical relationship of targeted pathways after CsA treatment, with ER stress identified as an early effector of CsA toxicity, which leads to ROS generation, phenotypical changes and cell death. In summary, this work presents a novel experimental approach to characterizing cellular responses to cytotoxics while pointing to new targets to prevent CsA-induced toxicity in proximal tubule cells.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Cyclosporine A (CsA) is an immunosuppressive agent widely used in the prevention of graft rejection and in the treatment of various autoimmune diseases (Kahan, 1993). Despite its beneficial effects, the use of CsA is restricted by its toxic side effects, the most important of which is renal toxicity (Myers et al., 1984). CsA nephrotoxicity is associated with acute changes in renal hemodynamics followed by irreversible tubular injury (Mihatsch et al., 1988). Originally, CsA-induced tubular alterations were proposed as being secondary to the intense effect of CsA on vasoconstriction; however, a direct tubular effect is now also accepted. Data in the literature indicate that cells in the proximal tubular region of the nephron are the major target of

CsA-induced toxicity in both animal models and humans (Burdmann et al., 2003). Alterations in proximal tubular morphology include swelling of the endoplasmic reticulum, cytoplasmic vacuolization and extensive interstitial fibrosis with patchy tubular atrophy and thickening of the tubular basement membrane (Myers et al., 1984). An increased rate of tubular cell apoptosis was observed in human renal biopsies obtained from patients with CsA nephrotoxicity (Ito et al., 1995), in rats (Shihab et al., 1999), and cell cultures (Xiao et al., 2011).

The molecular mechanisms underlying CsA nephrotoxicity have been related to activation of the intrarenal renin–angiotensin system (RAS) (Shang et al., 2008), increased release of endothelin (Papachristou et al., 2009), dysregulation of NOS (Bobadilla et al., 1998; Papachristou et al., 2009), upregulation of TGF β (Islam et al., 2001), stimulation of inflammatory mediators (LaSpina et al., 2008), enhanced innate immunity (Ghee et al., 2008), calcium homeostasis disturbance (Kuypers et al., 2004), ROS production (Rezzani, 2006), endoplasmic reticulum (ER) stress (Han et al., 2008; Pallet et al., 2008), autophagy (Pallet and Anglicheau, 2009), and aging and senescence (Jennings et al., 2007; Yoon et al., 2011). Nevertheless, it remains unclear whether CsA toxic effects on proximal tubule cells (PTC) are the consequence of direct activation of these pathways on PTC or, by contrast, toxicity results from paracrine signaling on their activation on non-tubular cells. The use of renal cells in culture has

* Correspondence to: E. Itarte, Departament de Bioquímica i de Biologia Molecular, Unitat de Bioquímica de Biociències, Universitat Autònoma de Barcelona, Edifici Cs, Campus de Bellaterra, 08193 Bellaterra (Barcelona), Spain. Fax: +34 935 811 264.

** Correspondence to: A. Meseguer, Renal Physiopathology, CIBBIM-Nanomedicine, Vall d'Hebron Institut de Research (VHIR), Pg. Vall d'Hebron 119-129, 08035 Barcelona, Spain. Fax: +34 934 894 015.

E-mail addresses: eduard.sarro@vhir.org (E. Sarró), conxita.jacobs@vhir.org (C. Jacobs-Cachá), emili.itarte@uab.es (E. Itarte), ana.meseguer@vhir.org, ameseguer@ir.vhebron.net (A. Meseguer).

¹ Share co-seniorship of this paper.

improved our insight into the molecular mechanisms involved in nephrotoxicity. Cultured cells provide an experimental model uninfluenced by higher order regulatory systems and distinguish the direct impact of CsA on proximal tubule cells from overlapping hemodynamically-mediated phenomena that occur in an *in vivo* system (Pfaller and Gstraunthaler, 1998). In the present work, we used the immortalized mouse proximal tubule-derived cell line PKSV-PCT3 (PCT3) that represents a valuable *in vitro* cell system for analyzing hormone-specific regulation of kidney-specific gene promoters (Isern and Meseguer, 2003), functional studies (Chassin et al., 2007) or CsA toxicity mechanisms (Cebrian et al., 2001; Puigmule et al., 2009; Sarro et al., 2008).

We and others have used proteomic (Puigmule et al., 2009) and genomic (Jennings et al., 2009) techniques to characterize genes and proteins up- or down-regulated by CsA in PTC. In the present work, we used a novel and complementary wide screening approach based on the use of known activities of a broad range of pharmaceuticals to study their interaction with CsA. By pharmacologically targeting multiple signaling pathways, we identified the signaling mechanisms that attenuate or potentiate CsA cytotoxicity, thereby providing a general view of the molecular events that follow CsA treatment in cultured proximal tubule cells.

Materials and methods

Reagents and antibodies. Antibodies from Cell Signaling (Danvers, MA, USA) were: cleaved caspase-9 (9509), P-Akt (9271), cleaved PARP (9544), PARP (9542), P-Bad (9296), Bad (9239) P-ERK (9106), P-GSK3 β (9331), P-JNK (9251), P-p38 (9211), p38 (9212), P-SMAD2 (3108), SMAD2 (3103), P-STAT3 Ser727 (9134), P-STAT3 Tyr705 (9138) and STAT3 (9132). Antibodies from Sigma (Saint Louis, MO, USA) were: actin (A5060) and α -SMA (2547). Antibodies from Santa Cruz (Santa Cruz, CA, USA) were: Akt (Sc-1618), eIF2 α (Sc-11386), GRP78 (Sc-13968), JNK (Sc-1648), p21 (Sc-397) and PKC β II (Sc-210).

Antibodies from Millipore (Temecula, CA, USA) were ERK (06-182) and GSK3 (05-412). E-cadherin (610181) was from BD Transduction Labs (Franklin Lakes, NJ, USA), P-eIF2 (1090-1) from Epitomics (Burlingame, CA, USA), and ZO-1 (33-9100) from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA).

Cyclosporine A, DMAT, GM6001 and wortmannin were from Calbiochem (San Diego, CA, USA). SB431542 and Z-VAD-FMK were from Tocris (Bristol, UK). PP1 and PP2 are from BioMol (Plymouth Meeting, PA, USA). BAPTA-AM was from Alexis (Plymouth Meeting, PA, USA). Salubrinol was from Santa Cruz (Santa Cruz, CA, USA). All other reagents were from Sigma (Saint Louis, MO, USA).

Cell culture. Mouse (PKSV-PCT, PCT3 clone) and human (HK-2) kidney proximal tubule cells (Cartier et al., 1993; Ryan et al., 1994) were cultured in medium A (DMEM:Ham's F12 (1:1, v/v), 20 mM HEPES, 2 mM L-glutamine, 12.5 mM D-glucose, 60 nM sodium selenite, 5 μ g/ml transferrin, 50 nM dexamethasone, 100 U/ml penicillin and 100 μ g/ml streptomycin) supplemented with 2% fetal bovine serum (FBS), 5 μ g/ml insulin, 10 ng/ml epidermal growth factor (EGF) and 1 nM triiodothyronine, at 37 °C in a 95:5 air:CO₂ water-saturated atmosphere. For all experiments, cells were seeded at 0.2×10^6 cells/ml and, after 24 h with complete medium, cells were starved for 16 h in medium A supplemented with 0.1% FBS but not insulin, EGF or triiodothyronine (starvation medium).

Cell viability and toxicity. Cell viability was assessed with Trypan Blue Dye (Gibco, Grand Island, NY, USA) and expressed as (number of viable cells/number of total cells) \times 100. CsA cytotoxicity was measured by LDH release assay using a commercial kit (LDH kit, Roche, Mannheim, Germany) according to the manufacturer's instructions. CsA stock solutions were prepared in absolute ethanol to a final concentration of 20 mM. For compound analysis, cells were seeded on 96 well plates and, after 24 h, medium was replaced by the starvation medium for a further 16 h. At the time of the experiment, the medium was replaced by the starvation medium containing each dose/

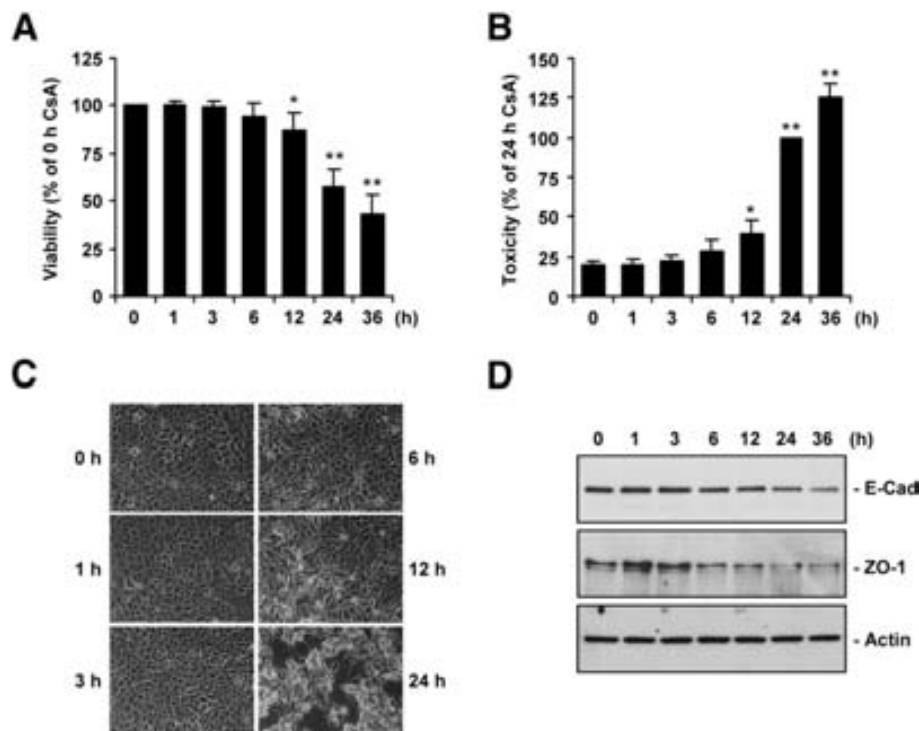


Fig. 1. CsA-induced cytotoxicity and morphologic changes in PCT3 cells. Mouse proximal tubule PCT3 cells were treated with 20 μ M CsA for the indicated times and cell viability (A) and cytotoxicity (B) were measured as indicated in Materials and methods. Data are the means of three different experiments. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ vs control (0 h) cells. (C) PCT3 cells were treated with 20 μ M CsA for the indicated times and protein levels of E-cadherin, ZO-1 and actin were analyzed by Western blot. (D) Phase-contrast microscopy of PCT3 cells treated with 20 μ M CsA for the indicated times.

compound and incubated for 30 min. Medium containing CsA alone or CsA+ compound was then added to previously pre-treated cells to a final concentration of 20 μM CsA for 24 h and LDH assay was then performed. Controls were made by adding the corresponding amount of CsA vehicle (absolute ethanol) and/or compound vehicle. Each compound and dose was tested per triplicate in at least three different experiments performed on different days.

Cell cycle. For cell cycle analysis, cells were trypsinized, fixed in -20°C , 70% ethanol and stored frozen for at least 24 h. On the day of the analysis, cells were centrifuged, washed with PBS and resuspended in 4 mM sodium citrate containing 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ RNAse and 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ propidium iodide. Fluorescence was measured by flow cytometry on a FACScan flow cytometer. Cell cycle analysis was performed by FCS Express software (De Novo Software, Los Angeles, CA, USA).

NF κ B activity. Cells were seeded on 24-well plates at 0.15×10^6 cells/well and incubated for 24 h. Plasmids were then transfected using Lipofectamine + Plus Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Cells were cotransfected with 0.6 ng/well of total DNA containing reporter plasmid NF κ B (Firefly luciferase gene with NF κ B promoter) + reporter plasmid RLTK (Renilla luciferase gene with thymidine kinase promoter) + negative control plasmid pCMV-HA (samples) or positive control plasmid (containing the p65 subunit of NF κ B). After a further 24 h, and when indicated, cells were treated for different times with CsA or CsA + CAPE. Cells were lysed and luciferase assay was performed using a luciferase assay kit. Transfection efficiency was normalized by the value of cotransfected Renilla luciferase.

Measurement of ROS generation. The assay is based on the incorporation of 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH) into the cell. Briefly, cells were washed twice with PBS, and fresh medium containing 20 μM DCFH was added to previously treated cells. After 30 min, cells were washed again, trypsinized and resuspended in cold PBS. Fluorescence was measured by flow cytometry on a FACScan flow cytometer.

Western blot. The protein content of cellular extracts was quantified by the Bradford assay. Total cell extract protein was run on SDS-PAGE gels, transferred onto PVDF membranes and incubated with the corresponding antibodies. The membranes were developed with the enhanced chemiluminescence method (Pierce, Rockford, IL, USA).

Statistical analyses. Results are expressed as mean \pm S.D. (standard deviation). The effect of each compound on CsA toxicity was analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA). A *post-hoc* test (LSD, least-squared differences) was used to determine the effect of each dose of the compound on CsA-induced toxic effects. For the remaining experiments, Student's *t*-test was used for statistical analysis. P values <0.05 were considered to indicate statistically-significant differences. Statistical analyses were made with commercially available software (Statgraphics Plus, Manugistics, Rockville, MD, USA).

Results

CsA induces changes in cell viability and morphology in PCT3 cells

CsA cytotoxicity in PCT3 cells was previously determined to start at a concentration of 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (8.31 μM), with doses of 25 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (20.78 μM) and 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (41.57 μM) producing similar toxic effects (Sarro et al., 2008). This CsA concentration range is in accordance with previous *in vitro* toxicologic studies performed in cultured proximal tubule cells reported in the literature (Jennings et

al., 2007; Puigmule et al., 2009). Taking these data into consideration, all experiments in the present work were conducted with 20 μM CsA. Our results show that CsA treatment led to a time-dependent decrease in cell viability with only $57.2 \pm 9.8\%$ of PCT3 cells excluding trypan blue dye upon treatment with 20 μM CsA for 24 h (Fig. 1A). CsA treatment also caused significant increase in LDH release (Fig. 1B), showing a good correlation between trypan blue staining and LDH release assays. Thereafter, LDH release after 24 h of CsA treatment was used as the parameter to monitor toxicity in all studies. Exposure of PCT3 cells to CsA also induced a progressive change in cell morphology: from a typical polygonal shape with a high degree of cell-cell attachment to a more elongated cell shape, with piling up of cells followed by cell detachment (Fig. 1C). These morphologic changes were paralleled by a significant reduction in the expression levels of the adherens junction protein E-cadherin and the tight junction protein

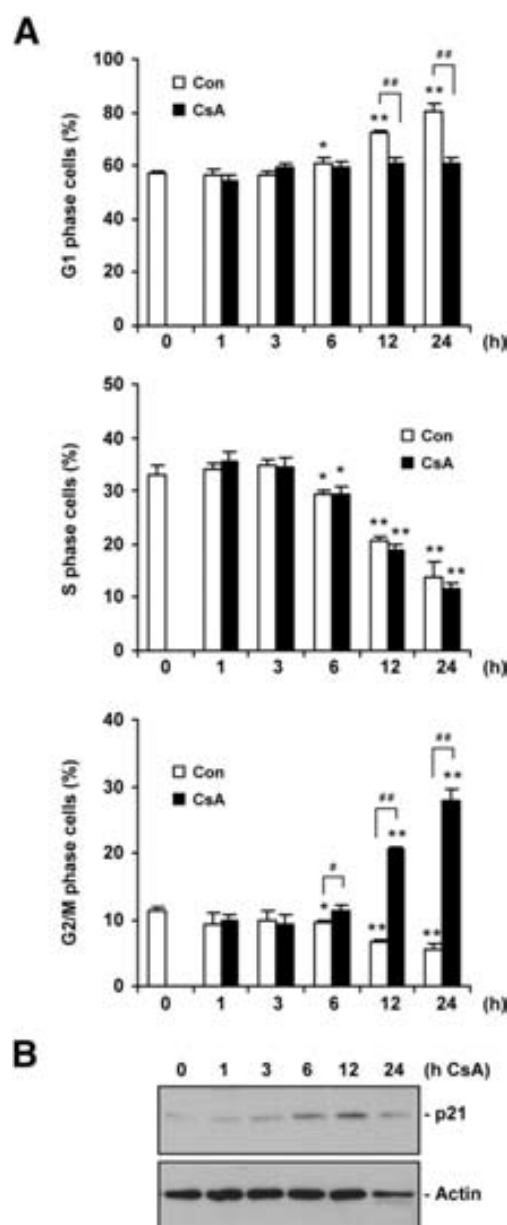


Fig. 2. CsA-induced cell cycle arrest at G2/M. (A) Mouse proximal tubule PCT3 cells were treated with 20 μM CsA for the indicated time points and the cell cycle was measured as indicated in Materials and methods. Data are the means of three different experiments. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.001$ vs control (0 h) cells. # $p < 0.05$ and ## $p < 0.001$ vs time-paired control cells. (B) PCT3 cells were treated with 20 μM CsA for the indicated times and p21 protein levels were analyzed by Western blot.

ZO-1 (Fig. 1D). Time-paired controls of E-cadherin and ZO-1 expression are shown in Fig. S1 (Supplemental Data).

Flow cytometry studies also showed that while non-treated cells were progressively arrested at the G1 phase due to serum starvation, CsA-treated cells underwent cell cycle arrest at G2/M (Fig. 2A). CsA-induced cell cycle arrest at G2/M was preceded by an increase in expression of the cell cycle inhibitor p21 (Fig. 2B). Time-paired controls of p21 expression are shown in Fig. S2 (Supplemental Data).

Effect of compound pre-treatment on CsA-induced cytotoxicity

In order to elucidate the molecular mechanisms involved in CsA-induced cytotoxic effects, we used an array of compounds to selectively inhibit putatively-relevant CsA-related pathways. Compounds and the range of the doses tested were selected according to previous data in the literature. Cell treatments were performed as described in Materials and methods. Briefly, cells seeded on 96-well plates were

treated with each dose of the compound 30 min before the addition of 20 μ M CsA or vehicle alone (ethanol) for 24 h. Cytotoxicity was then determined using an LDH release assay. In order to simplify the posterior analysis, doses which, in the absence of CsA, showed LDH values that differed significantly from control LDH values were ruled out (see Supplementary Data, Table A.1). The effect of compound pre-treatment on CsA-induced toxicity is summarized in Table 1. Compounds were grouped by categories and their most accepted target is indicated. Table 1 also shows the lowest dose of compound that significantly modified CsA toxicity and the dose that exerted the maximum effect. To quantitatively express the effect of each dose of inhibitor on CsA-induced toxicity, LDH release values were converted into percentages of rescue, and the values obtained for vehicle-treated cells were set at 100% and the CsA-treated cells values at 0%.

Compounds that blocked protein synthesis and apoptosis, together with the CK2 inhibitor DMAT and the PI3K inhibitor apigenin, were the most efficient in preventing CsA toxicity. GSK3, MMPs and PKC

Table 1
Effect of compound pre-treatment on CsA-induced cytotoxicity in PCT3 cells.

Group	Compound	Target/function	Doses tested	p value ^a	Lowest effective dose ^b	Most effective dose ^c	Rescue (in %) ^d	
Kinase inhibitor	AG490	JAK2	0/5/10/25 μ M	<0.0001	10	10	-74	
	Apigenin	PI3K	0/1/10/50 μ M	<0.0001	50	50	89	
	DMAT	CK2	0/1/10/50 μ M	<0.0001	1	50	86	
	GF109203X	PKC α , β , δ , and ϵ	0/5/10/20 μ M	<0.0001	5	20	55	
	Hispidin	PKC β	0/5/10/20 μ M	<0.0001	5	5	16	
	LY294002	PI3K	0/0.5/1/5/10 μ M	<0.0001	1	10	65	
	PD98059	MEK1/2	0/10/20/40 μ M	0.0004	20	40	35	
	PP1	Src	0/1/10 μ M	0.0827	-	-	-	
	PP2	Src	0/1/10 μ M	0.0732	-	-	-	
	Quercetin	PI3K	0/1/10/50 μ M	0.0096	1	10	72	
	SB203580	p38	0/5/10/25 μ M	0.0065	10	25	19	
	SB216763	GSK3 α / β	0/1/5/10 μ M	0.0028	1	10	54	
	SB415286	GSK3 α / β	0/1/10/40 μ M	0.0020	1	40	72	
	SB431542	TGF- β 1 receptor	0/1/5/10 μ M	0.1905	-	-	-	
	SP600125	JNK	0/5/10/25 μ M	0.0049	5	25	26	
	TBB	CK2	0/1/10 μ M	<0.0001	10	10	-81	
	TBCA	CK2	0/2/20/50 μ M	<0.0001	20	50	-158	
	Wortmannin	PI3K	0/50/100/200 nM	0.0001	100	200	62	
	Calcium-related Oxidative stress	A23187	Ca ²⁺ ionophore	0/25/75/300/1000 nM	0.0725	-	-	-
		BAPTA-AM	Ca ²⁺ chelator	0/1/10/25 μ M	0.2742	-	-	-
Calcitriol		Vitamin D	0/0.1/0.5/1/5 μ M	<0.0001	5	5	-25	
EDTA		Ca ²⁺ chelator	0/0.1 mM	0.3347	-	-	-	
MDL28170		Calpain inhibitor	0/1/10/50 μ M	<0.0001	1	50	-150	
Verapamil		Ca ²⁺ channel blockade	0/1/10/50 μ M	0.1190	-	-	-	
W13		CaM inhibitor	0/1/10 μ M	0.0955	-	-	-	
Apocinin		NADPHox inhibitor	0/1/10/100 μ M	0.0755	-	-	-	
Catalase		H ₂ O ₂ decomposition	0/10/100 U/ml	0.2706	-	-	-	
GSH		Reducing agent	0/0.1/1 mM	0.1034	-	-	-	
NAC		GSH precursor	0/0.1/1 mM	0.6737	-	-	-	
Tempol		Superoxide scavenger	0/10/100/500 μ M	0.1108	-	-	-	
Tiron		SOD mimetic	0/0.1/0.5/1 mM	0.1650	-	-	-	
Trolox		Vitamin E derivative	0/0.05/0.1/1/5 mM	0.1086	-	-	-	
Angiotensin II inhibitor		Enalapril	ACE	0/1/10/100 μ M	0.0139	100	100	-37
	PD123,319	AT2 receptor	0/1/10/100 μ M	0.1194	-	-	-	
	Telmisartan	AT1 receptor	0/1/10 μ M	<0.0001	10	10	-89	
Endothelin inhibitor	PD145065	ET-1 receptor	0/0.5/1/5/10 μ M	0.0766	-	-	-	
Protein synthesis inhib.	Anisomycin	Translational elongation	0/1/5/10 μ M	0.0065	1	5	88	
	Cycloheximide	Translational elongation	0/1/5/10 μ g/ml	<0.0001	1	1	95	
	Salubrinol	eIF2 α phosphatase	0/10/75/150/300 μ M	<0.0001	75	150	100	
Others	Brefeldin-A	ER-Golgi transport inhib.	0/0.1 μ g/ml	0.8310	-	-	-	
	CAPE	NF- κ B inhibitor	0/0.1/0.5 μ g/ml	<0.0001	0.5	0.5	-105	
	Chondroitinase	GAGs degradation	0/0.05/0.1/0.5 U/ml	0.0008	0.05	0.5	23	
	GM6001	MMPs inhibitor	0/10/20/40 μ M	<0.0001	10	40	71	
	Heparinase-I	GAGs degradation	0/1/5/10 U/ml	0.0021	1	10	59	
	L-NN	NOS inhibitor	0/0.1/1	0.1397	-	-	-	
	Z-VAD-FMK	Pan Caspase inhibitor	0/10/50/100	<0.0001	10	50	79	

Negative values (in italics) indicate the percentage of potentiation of CsA-induced toxicity.

^a Statistical effect of the doses of the compound tested on CsA-induced toxicity (one-way ANOVA).

^b Indicates the lowest dose of each compound that significantly differs from CsA-treated cells in the absence of compound (LSD post hoc test).

^c Indicates the dose of each compound that showed the greatest difference from CsA-treated cells in the absence of compound (LSD post hoc test).

^d Indicates the percentage of rescue achieved at the most effective dose of each compound, giving the value of 0% to CsA-treated cells in the absence of compound and the value of 100% to vehicle-treated control cells.

inhibitors also afforded elevated percentages of rescue. Additionally, heparinase-I and MAPK inhibitors exerted partial but significant protection. Antioxidants were unable to ameliorate CsA-induced cytotoxicity. Compounds such as AG490, TBB, TBCA, MDL28170, telmisartan and CAPE dramatically potentiated CsA-induced toxicity.

CsA-induced GSK3-mediated apoptosis overcomes Akt pro-survival signaling

PI3K and apoptosis inhibitors abolished CsA-induced cytotoxicity (Table 1). Since PI3K-dependent Akt/PKB activation has been traditionally involved in survival (Franke et al., 2003), we studied its relationship with apoptosis. Treatment with CsA led to Akt activation and the further phosphorylation and inhibition of the pro-apoptotic Akt downstream target GSK3 α/β and Bad (Fig. 3A). The involvement of PI3K/Akt in GSK3 α/β and Bad phosphorylation is shown in Fig. 3B. However, CsA-induced Akt activation was transient and its dephosphorylation and consequent inactivation paralleled activation of caspase-9 and poly-ADP-ribose polymerase (PARP) cleavage (Fig. 3C), both dependent on GSK3 α/β activity (Fig. 3D). These results

suggest that CsA treatment would trigger the simultaneous activation of different PI3K isoforms; while the transient activation of the canonical PI3K/Akt axis represents an unsuccessful attempt by the cell to survive through GSK3 α/β and Bad inhibition, another inhibitor-sensitive PI3K isoform would be implicated in CsA-induced cell death.

CsA induces ER stress and ROS generation

Results showed that protein synthesis blockade with cycloheximide (CHX), anisomycin or salubrinal conferred protection against CsA cytotoxicity, thereby suggesting the involvement of protein overload and ER stress in CsA toxicity (Table 1). In this respect, CsA treatment induced transient phosphorylation of eIF2 α and progressive expression of the chaperone GRP78, both indicators of an ER stress response (Fig. 4A). Akt activation, GRP78 expression and PARP cleavage in response to CsA were effectively prevented by salubrinal and CHX (Fig. 4B).

Oxidative stress has been implicated in CsA nephrotoxicity (Rezzani, 2006), and our results show that CsA induced a time-

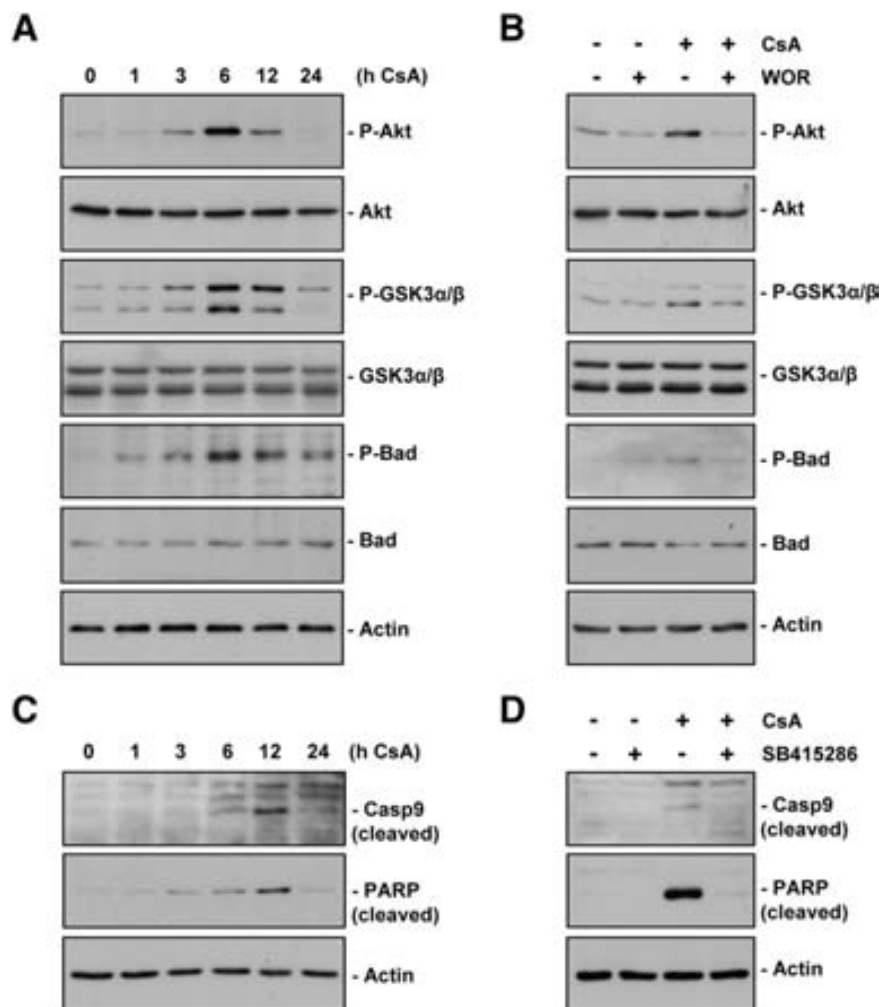


Fig. 3. CsA-induced GSK3-mediated apoptosis overcomes Akt pro-survival signaling. (A) PCT3 cells were treated with 20 μ M CsA for the indicated times and the phosphorylation levels of Ser473 (Akt), Ser21/9 (GSK3 α/β) and Ser112 (Bad) were analyzed by Western blot with the corresponding phospho-specific antibodies. Expressions of whole-cell Akt, GSK3 α/β and Bad were also identified. (B) PCT3 cells were pre-treated with 200 nM of the PI3K inhibitor wortmannin (WOR) for 30 min before the addition of 20 μ M CsA for 6 h. Phosphorylation levels of Akt, GSK3 and Bad were analyzed as above. (C) PCT3 cells were treated with 20 μ M CsA for the indicated times and caspase-9 activation and PARP cleavage were analyzed. Cleaved caspase-9 antibody (mouse-specific) detects endogenous levels of the 37 kDa subunit of mouse caspase-9 only after cleavage at Asp353. Cleaved PARP antibody (mouse-specific) detected endogenous levels of the large fragment (89 kDa) of mouse PARP1 resulting from caspase cleavage. These antibodies do not recognize full-length caspase-9 or PARP1. (D) PCT3 cells were pre-treated with 40 μ M of the GSK3 α/β inhibitor SB415286 for 30 min before the addition of 20 μ M CsA for 12 h. Caspase-9 activation and PARP cleavage were analyzed as above.

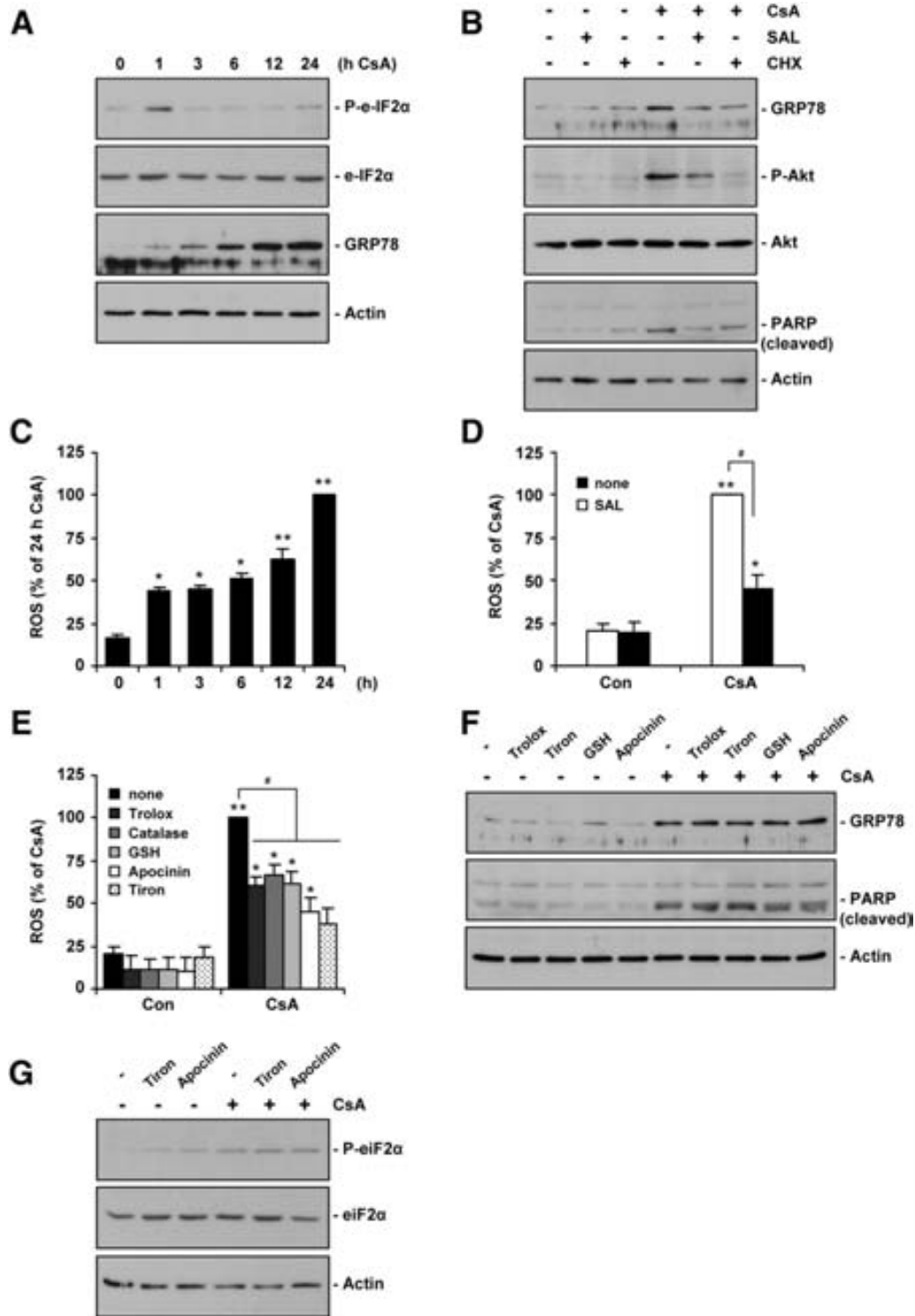


Fig. 4. CsA treatment induced ER stress and ROS generation in PCT3 cells. (A) PCT3 cells were treated with 20 μ M CsA for the indicated times and eIF2 α phosphorylation (Ser51) levels, whole-cell eIF2 α and GRP78 expressions were determined by Western blot. (B) PCT3 cells were pre-treated with 100 μ M salubrinal (SAL) or 1 μ g/ml cycloheximide (CHX) for 30 min prior to the addition of 20 μ M CsA or vehicle alone for 9 h. GRP78 expression, Akt phosphorylation (Ser473) levels, whole-cell Akt and cleaved PARP were detected by Western blot. (C) PCT3 cells were treated with 20 μ M CsA for the indicated times and ROS generation was determined as indicated in [Materials and methods](#). Data are the means of three different experiments taking the value of cells treated for 24 h with CsA as 100%. * p <0.05 and ** p <0.01 vs control (0 h) cells. (D) PCT3 cells were pre-treated with 100 μ M salubrinal before the addition of 20 μ M CsA or vehicle alone for 9 h and ROS generation was determined as above. * p <0.05 and ** p <0.001 vs vehicle control cells. # p <0.001 vs CsA-treated cells. (E and F) PCT3 cells were treated with 1 mM trolox, 1000 U/ml catalase, 1 mM GSH, 1 μ M apocinin, or 1 mM tiron 30 min before the addition of 20 μ M CsA for 9 h, and ROS generation (E) and GRP78 expression and PARP cleavage (F) were determined as above. * p <0.05 and ** p <0.001 vs vehicle control cells. # p <0.05 vs CsA-treated cells. (G) PCT3 cells were pre-treated for 30 min with 1 mM tiron or 1 μ M apocinin before treatment with 20 μ M CsA for 1 h, and eIF2 α phosphorylation (Ser51) and whole-cell eIF2 α were determined by Western blot.

dependent increase in reactive oxygen species (ROS) (Fig. 4C). However, none of the antioxidants tested protected against CsA cytotoxicity (Table 1). Since ER stress and ROS generation have been intimately

linked (Malhotra and Kaufman, 2007), we aimed to ascertain whether both phenomena were related on CsA treatment. Salubrinal prevented CsA-induced ROS generation (Fig. 4D). On the other hand, although

antioxidants significantly prevented CsA-induced ROS generation (Fig. 4E), they had no effect on CsA-triggered GRP78 expression, PARP cleavage or eIF2 α phosphorylation (Figs. 4F and G). Taken together, these results indicate that, in PCT3 cells, CsA-induced ROS generation was a consequence of ER stress.

Since ER stress appeared as a putative cause of CsA cytotoxicity, we then studied whether compounds exerting high protection scores against CsA cytotoxicity (Table 1) could prevent CsA-induced GRP78 expression. Our results show that pre-treatment with DMAT effectively prevented GRP78 expression and PARP cleavage (Fig. 5B) while PI3K, PKC, MMPs and GSK3 α/β inhibition prevented PARP cleavage without preventing GRP78 expression (Figs. 5A, C, D and E, respectively).

CsA activates MAPKs pathway

Results also indicated that MAPK inhibition partially protected against CsA cytotoxicity (Table 1). Moreover, all three families of MAPK were activated in response to CsA (Fig. 6A). We next analyzed whether MAPK activation was a consequence of CsA-triggered ER stress. CHX blocked ERK activation induced by CsA but enhanced JNK and p38 responses. Salubrinal blocked CsA-induced ERK and p38 activation but had no effect on JNK activation (Fig. 6B).

CsA-induced down-regulation of E-cadherin and ZO-1 is dependent on ER stress but independent of PKC β -mediated SMAD2 activation

PKC blockade partially protected against CsA cytotoxicity (Table 1). Since it has been reported that CsA-induced TGF β signaling during the fibrotic process in kidney tubular cells is mediated by PKC β (Slattery et al., 2005), we wondered whether PKC also triggered TGF β signaling in CsA-treated PCT3 cells. CsA treatment induces expression of PKC β II and phosphorylation of SMAD2, a well-known downstream target of the TGF β pathway (Fig. 7A). The selective PKC β inhibitor hispidin and the wide-range PKC inhibitor GF109303X effectively prevented SMAD2 activation by CsA (Fig. 7B). Salubrinal pre-treatment also blocked CsA-induced SMAD2 activation (Fig. 7C), suggesting that PKC may act downstream of ER stress. Then we wished to ascertain whether down-regulation of E-cadherin and ZO-1 was due to ER stress through TGF β /SMAD2 signaling. Our results showed that salubrinal but not SB431542, a selective inhibitor of TGF- β type I receptor, fully restored E-cadherin and ZO-1 levels (Fig. 7D). Moreover, CsA was unable to induce α -SMA expression (Fig. 7E). These results suggest that CsA-induced ER stress triggers loss of epithelial markers independently of PKC β -mediated TGF β signaling. Since adhesion molecules are MMPs substrates, we aimed to ascertain whether E-cadherin and ZO-1 down-regulation after CsA treatment were mediated by MMPs.

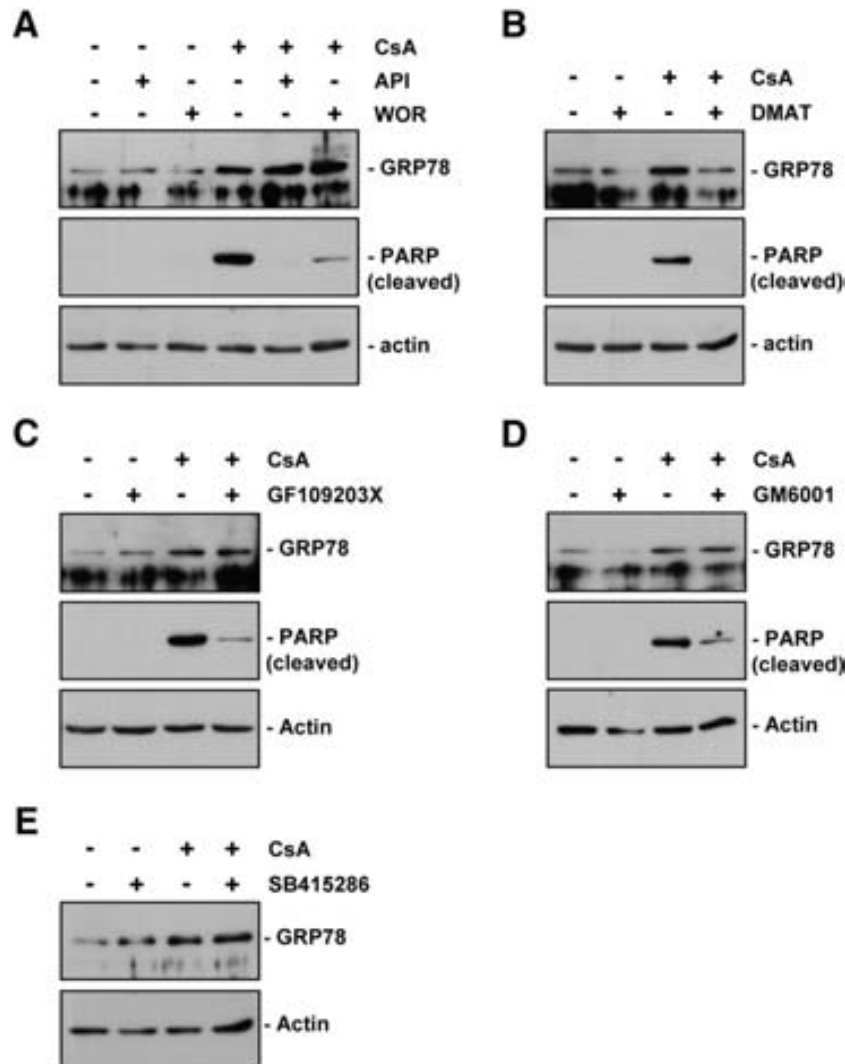


Fig. 5. Effect of PI3K, CK2, PKC, MMP and GSK3 inhibitors on GRP78 expression and PARP cleavage. PCT3 cells were pre-treated with 50 μ M and 200 nM, respectively, of the PI3K inhibitors apigenin (API) and wortmannin (WOR) (A); 50 μ M of the CK2 inhibitor DMAT (B); 20 μ M of the PKC inhibitor GF109203X (C); 40 μ M of the MMP inhibitor GM6001 (D); and 40 μ M of the GSK3 inhibitor SB415286 (E), prior to the addition of 20 μ M CsA for 12 h. Expression levels of GRP78 and cleaved PARP were analyzed as mentioned above.

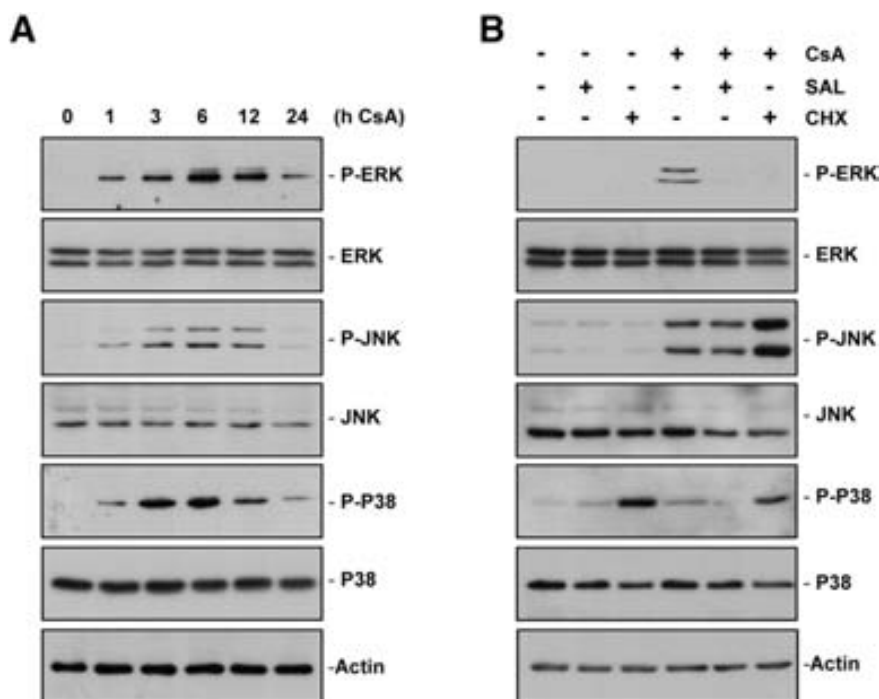


Fig. 6. CsA induced MAPK activation. (A) PCT3 cells were treated with 20 μ M CsA for the indicated times and the phosphorylation state of ERK1/2 (Thr202/Tyr204), JNK (Thr183/Tyr185) and p38 (Thr180/Tyr182), as well as the whole-cell expression of each protein, was analyzed using the corresponding antibodies as indicated in **Materials and methods**. (B) PCT3 cells were pre-treated with 100 μ M salubrinal (SAL) or 1 μ g/ml cycloheximide (CHX) 30 min before the addition of 20 μ M CsA for 6 h. ERK, JNK and p38 phosphorylation states were analyzed as above.

Results indicated that pre-treatment with the MMPs inhibitor GM6001 partially prevented CsA-induced ZO-1 down-regulation, and had little effect on E-cadherin down-regulation (Fig. 7F).

NF κ B mediates JAK/STAT pathway activation in response to CsA

Results showed that inhibition of certain pathways potentiated CsA toxicity, thereby suggesting that their activation in CsA-treated cells might favor survival (Table 1). As an example, the JAK2 inhibitor AG490 enhanced CsA cytotoxicity despite previous reports linking JAK2 activation with tubular cell injury (Arany et al., 2006) and CsA-induced cell death (Neria et al., 2009). JAK2 activation in response to CsA in PCT3 cells was demonstrated by the increase in phosphorylation of STAT3 at Tyr705 and Ser727 (Fig. 8A) which was, in turn, effectively blocked by AG490 (Fig. 8B). We also observed that the NF κ B inhibitor CAPE enhanced CsA toxicity. Luciferase reporter assay confirmed that CsA treatment induced a time-dependent activation of NF κ B (Fig. 8C), and that CAPE effectively prevented this activation (Fig. 8D). Since the JAK/STAT pathway was reported to be activated in response to NF κ B-regulated cytokines, we aimed to ascertain whether NF κ B was involved in JAK2 activation. Our results show that CAPE inhibited STAT3 phosphorylation (Fig. 8E), thereby suggesting the involvement of NF κ B up-regulated genes in JAK2 activation.

Effect of compound pre-treatment on CsA-induced toxicity in human HK-2 cells

To ascertain whether these compounds could also rescue CsA-induced toxicity in human-derived proximal tubule cells, we took the compounds with the highest protection scores obtained in mouse PCT3 cells (Table 1) and evaluated their effect on the human cell line HK-2 (Table 2). We also studied the effects of antioxidant pre-treatment on CsA-induced toxicity in HK-2 cells. Our results show that, as occurred in mouse PCT3 cells, compounds that blocked protein synthesis and apoptosis, together with the GSK3 α / β inhibitor

SB415286 and the PI3K inhibitor apigenin, were the most efficient in preventing CsA-induced toxicity in HK-2 cells. The PI3K inhibitors wortmannin and LY294002, and the PKC inhibitor GF109203X also afforded elevated percentages of rescue in HK-2 cells. As observed in PCT3 cells, antioxidants were unable to ameliorate CsA-induced cytotoxicity in HK-2 cells (Table 2).

To further demonstrate the involvement of ER stress-mediated apoptosis in CsA-induced toxicity in human HK-2 cells, we used an antibody that detects full-length human PARP1 (116 kDa) as well as the large fragment (89 kDa) resulting from caspase cleavage. CsA treatment of HK-2 cells induced a time-dependent cleavage of PARP (Fig. 9A). Pre-treatment with the pan caspase inhibitor Z-VAD-FMK (Fig. 9B) or the protein synthesis inhibitor salubrinal (Fig. 9C) effectively prevented PARP cleavage in HK-2 cells.

Discussion

In vitro cell-based models permit high-throughput, cost-effective screening of chemicals to evaluate their putative effects on a biological system. In the present work, we applied a pharmacologic approach to characterize signaling pathways involved in CsA cytotoxicity in a mouse kidney proximal tubule-derived cell line (PCT3 cells). CsA treatment of PCT3 cells induced a time-dependent increase in cell toxicity phenotypically characterized by morphologic changes and a progressive piling up of cells that finally ended in cell detachment. These morphologic changes are probably the result of a loss of cell–cell contacts since we observed that E-cadherin and ZO-1 levels, which are involved in the adherens and tight junctions, respectively, were diminished after CsA treatment. Pre-treatment of PCT3 cells with a wide range of pharmaceuticals of known activities modulated CsA-induced toxicity differently, allowing us to identify signaling pathways important for CsA-triggered toxicity. Compounds could then be roughly classified according to their ability to prevent CsA toxicity. Compounds that afforded 75–100% protection included: i) protein synthesis inhibitors such as the transduction elongation inhibitors cycloheximide and anisomycin, and the eIF2 α dephosphorylation

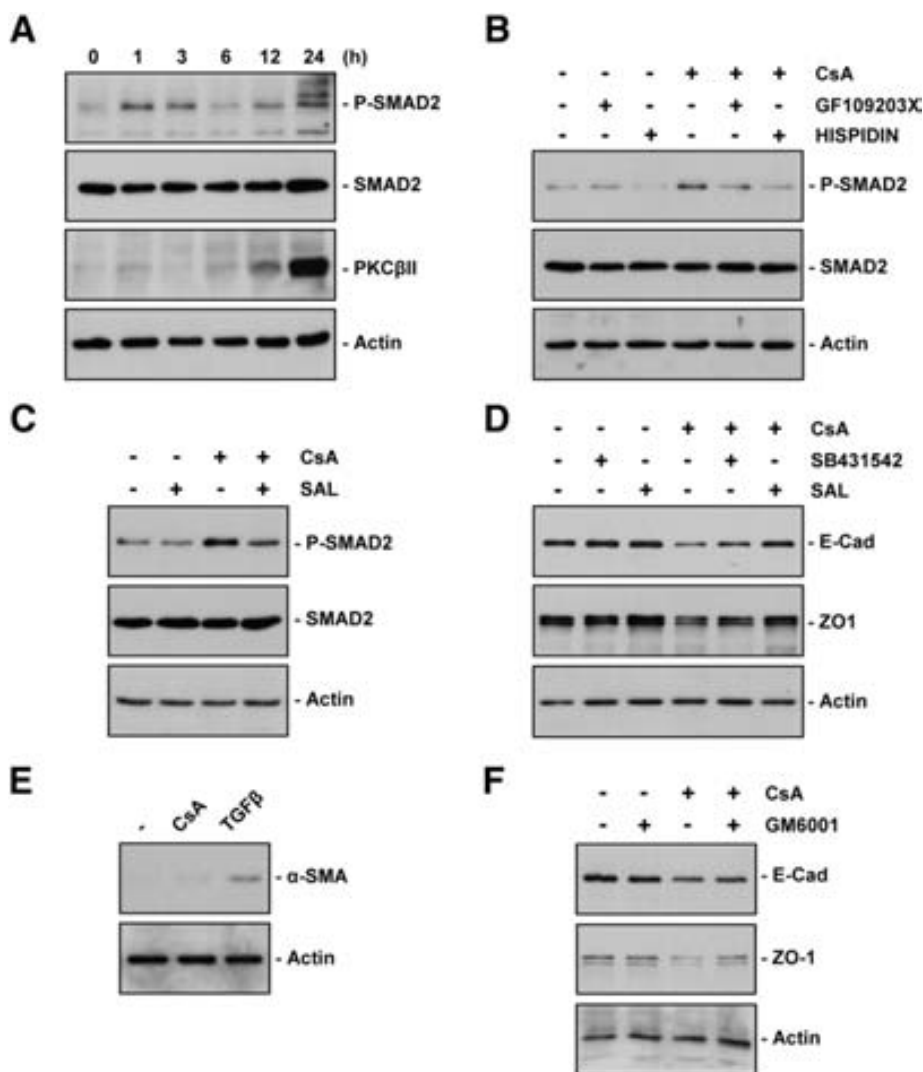


Fig. 7. PKC β -mediated SMAD2 activation was not involved in ER stress-triggered morphologic changes in response to CsA. (A) PCT3 cells were treated with 20 μ M CsA for the indicated times and SMAD2 phosphorylation (Ser465/467) levels, whole-cell SMAD2 and PKC β II expressions were determined by Western blot. (B) PCT3 cells were pre-treated with 20 μ M of the PKC α , β , δ , and ϵ inhibitor GF109203X or with 20 μ M of the specific PKC β inhibitor hispidin 30 min before the addition of CsA for 12 h. SMAD2 phosphorylation (Ser465/467) levels and whole-cell SMAD2 were determined using the corresponding antibodies. (C) PCT3 cells were pre-treated with 100 μ M salubrinal (SAL) before the addition of 20 μ M CsA or vehicle alone for 12 h, and SMAD2 phosphorylation was determined as above. (D) PCT3 cells were pre-treated with 100 μ M salubrinal (SAL) or 25 μ M of the TGF β type I receptor inhibitor SB431542 before the addition of 20 μ M CsA or vehicle alone for 24 h. E-cadherin and ZO-1 levels were analyzed with the corresponding antibodies. (E) PCT3 cells treated with 20 μ M CsA or with 5 ng/ml TGF β for 24 h and the expression levels of α SMA, a marker of epithelial–mesenchymal transition, were analyzed. (F) PCT3 cells were pre-treated with 40 μ M of the MMP inhibitor GM6001 before the addition of 20 μ M CsA or vehicle alone for 24 h. E-cadherin and ZO-1 levels were analyzed with the corresponding antibodies.

inhibitor salubrinal; ii) the pan caspase inhibitor Z-VAD-FMK; iii) the PI3K inhibitor apigenin; and iv) the CK2 inhibitor DMAT. A second group of compounds that afforded 50–75% rescue included: i) the MMP inhibitor GM6001; ii) the PI3K inhibitors quercetin, its derivative LY294002 and wortmannin; iii) GSK3 α / β inhibitors; iv) heparinase-I; and v) the PKC inhibitor GF109203X. Compounds that afforded less than 50% protection were: i) MAPK inhibitors; ii) the PKC β inhibitor hispidin; and iii) chondroitinase-ABC. It was interesting to note that another set of compounds potentiated CsA-induced toxicity, either because their combination with CsA would enhance the toxic effects of the immunosuppressant or because the pathway they target would be involved in pro-survival signaling. These compounds include the JAK2 inhibitor AG490, the CK2 inhibitors TBB and TBCA, the calpain inhibitor MDL28170, the AT1 receptor telmisartan and the NF κ B inhibitor CAPE.

Signaling pathways related to compounds that exerted protective effects against CsA toxicity were then further studied. It has been reported that protein translation inhibition aids cell survival by decreasing the load of nascent proteins at the ER (Szegezdi et al.,

2006). Since we observed that protein synthesis inhibitors prevented CsA toxicity, we propose that prolonged accumulation of unfolded proteins inside the ER lumen and subsequent ER stress act as an early effector in CsA toxicity. ER stress in response to CsA has been described previously *in vitro* and *in vivo* (Han et al., 2008; Pallet et al., 2008). Pallet et al. suggested that CsA-induced ER stress could be the consequence of cyclophilin A inhibition and, more recently, Bernasconi et al. reported that CsA, through cyclophilin B peptidylprolyl cis/trans isomerase activity inhibition, selectively inhibits the degradation of a subset of misfolded proteins generated in the ER (Bernasconi et al., 2010). Induction of ER stress after CsA treatment was confirmed by activation of the unfolded protein response (UPR), characterized by eIF2 α phosphorylation and GRP78 expression. Protein synthesis blockade effectively prevented GRP78 expression and PARP cleavage. Salubrinal also reduced CsA-induced ROS generation while antioxidants failed to prevent GRP78 expression, eIF2 α phosphorylation and cell death. These results suggest that, in PCT3 cells, increased ROS levels after CsA treatment might be a

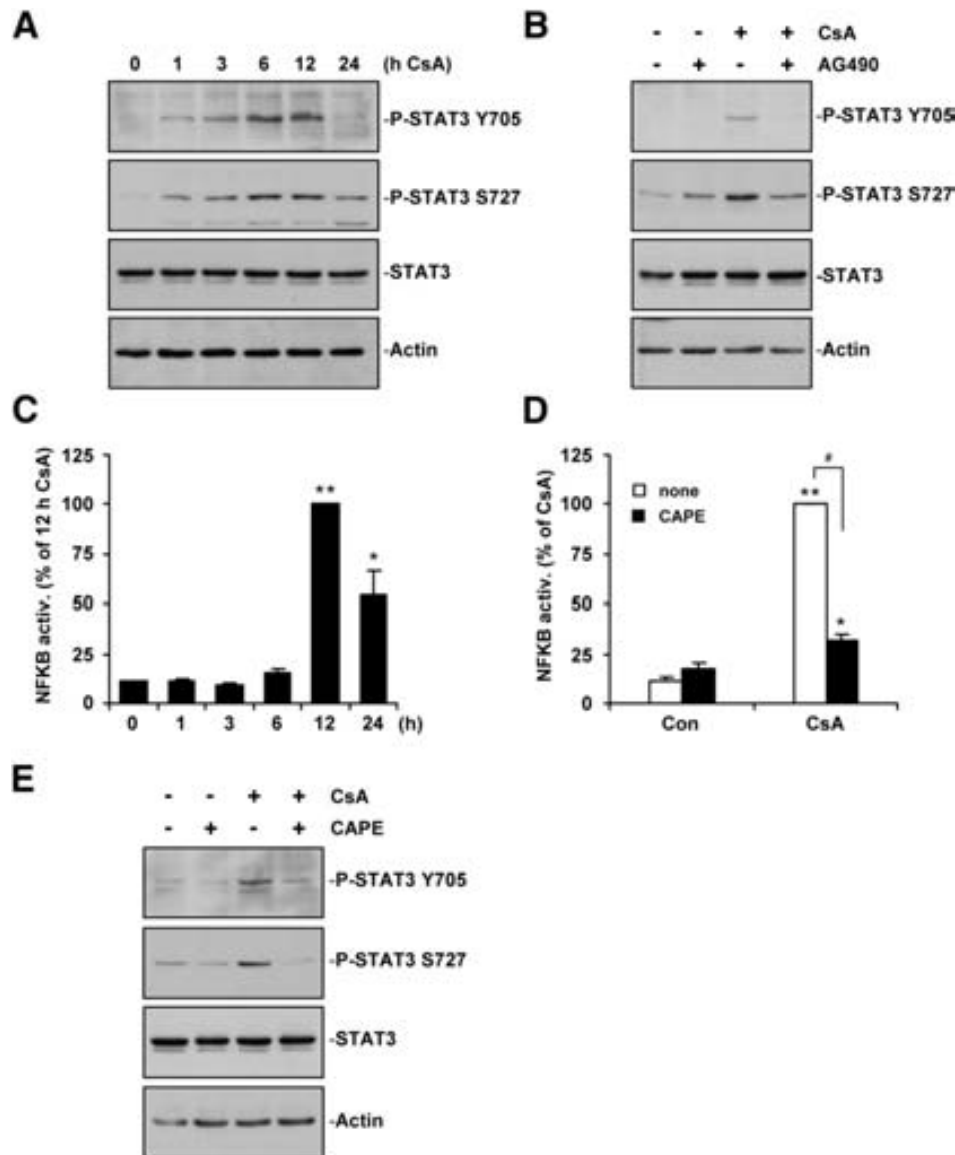


Fig. 8. CsA triggered NF κ B-mediated JAK2/STAT3 activation. (A) PCT3 cells were treated with 20 μ M CsA for the indicated times and the phosphorylation state of STAT3 (Tyr705 and Ser727) was analyzed using phospho-specific antibodies. The expression of whole-cell STAT3 was also identified. (B) PCT3 cells were pre-treated with 25 μ M of the JAK2 inhibitor AG490 before treatment with 20 μ M CsA for 9 h. STAT3 phosphorylation was analyzed as above. (C) PCT3 cells were treated with 20 μ M CsA for the indicated times and NF κ B activity was measured as indicated in *Materials and methods*. Data are the means of three different experiments taking the value of 12 h CsA-treated cells as 100%. * p <0.01 and ** p <0.001 vs control (0 h) cells. (D) PCT3 cells were treated with 0.5 μ g/ml of the NF κ B inhibitor CAPE 30 min before the addition of 20 μ M CsA for 12 h, and NF κ B activity was measured as above. Data are the means of three different experiments taking the value of 12 h CsA-treated cells as 100%. * p <0.05 and ** p <0.01 vs vehicle control cells. # p <0.001 vs CsA-treated cells. (E) PCT3 cells were treated with 0.5 μ g/ml of the NF κ B inhibitor CAPE 30 min before the addition of 20 μ M CsA for 12 h and STAT3 phosphorylation and whole-cell STAT3 were analyzed with specific antibodies.

consequence of ER stress. Moreover, our results indicate that ROS generation is not directly involved in cell death. It is worth mentioning that none of the compounds mentioned before, except DMAT, were able to prevent GRP78 expression, thereby suggesting that their respective targets may act downstream of CsA-induced ER stress. In this respect, it has been reported that DMAT blocked UPR activation caused by rotenone (Sugeno et al., 2008). The mechanism of action of DMAT remains unclear but could not be attributable to CK2 inhibition, since we observed that pre-treatment with the canonical CK2 inhibitors TBB and the more potent and specific TBCA (Pagano et al., 2007; Pagano et al., 2008) afforded no protection against CsA toxicity. Thus, the protective effects of DMAT could be related to its “off-target” effects described by Duncan et al. (2008).

We also observed that CsA toxicity was triggered by GSK3-mediated activation of caspase-9 and consequent PARP cleavage, resulting in apoptosis. It is noteworthy that we were unable to

observe PARP cleavage after 24 h of CsA treatment. These data are consistent with previous observations showing that nucleus staining of PCT3 cells did not show chromatin condensation or increased p53 levels after 24 h of CsA treatment (Jennings et al., 2007; Sarro et al., 2008). Since caspase blockade completely prevented LDH release, which reflects necrotic rather than apoptotic cell injury, our results suggest that initial apoptosis switched to other forms of cell death, namely necrosis. Moreover, GSK3 inhibitors were unable to prevent GRP78 expression while protein synthesis blockade effectively prevented PARP cleavage, thereby suggesting that GSK3 activation of caspase-9 should be the result of CsA-induced ER stress. Caspase-9 is the apical caspase of apoptosis resulting from mitochondrial injury (Sun et al., 1999). Therefore, our experiments support the involvement of the intrinsic/mitochondrial pathway in CsA-induced apoptosis in PCT3 cells, as previously reported (Justo et al., 2003). Taken together, our results suggest that CsA-induced ER stress results in

Table 2
Effect of compound pre-treatment on CsA-induced cytotoxicity in HK-2 cells.

Group	Compound	Target/function	Doses tested	p value ^a	Lowest effective dose ^b	Most effective dose ^c	Rescue (in %) ^d
Kinase inhibitor	Apigenin	PI3K	0/1/10/50 μ M	<0.0001	1	50	80
	GF109203X	PKC α , β , δ , and ϵ	0/5/10/20 μ M	<0.0001	5	5	51
	LY294002	PI3K	0/0.5/1/10 μ M	<0.0001	0.5	10	49
	SB216763	GSK3 α / β	0/1/5/10 μ M	0.0001	1	10	41
	SB415286	GSK3 α / β	0/10/20/40 μ M	<0.0001	20	40	88
	Wortmannin	PI3K	0/50/100/200 nM	0.0353	100	100	63
Oxidative stress	Catalase	H ₂ O ₂ decomposition	0/10/100/1000 U/ml	0.1794	–	–	–
	GSH	Reducing agent	0/0.1/0.5/1 mM	0.9167	–	–	–
	Tiron	SOD mimetic	0/0.1/0.5/1 mM	0.7484	–	–	–
Protein synthesis inhib.	Cycloheximide	Translational elongation	0/1 μ g/ml	<0.0001	1	1	73
	Salubrinal	eIF2 α phosphatase	0/75/150/300 μ M	<0.0001	75	300	95
Others	GM6001	MMPs inhibitor	0/10/20/40 μ M	0.3808	–	–	–
	Z-VAD-FMK	Pan Caspase inhibitor	0/10/50/100	<0.0001	10	100	93

Negative values (in italics) indicate the percentage of potentiation of CsA-induced toxicity.

^a Statistical effect of the doses of the compound tested on CsA-induced toxicity (one-way ANOVA).

^b Indicates the lowest dose of each compound that significantly differs from CsA-treated cells in the absence of compound (LSD post hoc test).

^c Indicates the dose of each compound that showed the greatest difference from CsA-treated cells in the absence of compound (LSD post hoc test).

^d Indicates the percentage of rescue achieved at the most effective dose of each compound, giving the value of 0% to CsA-treated cells in the absence of compound and the value of 100% to vehicle-treated control cells.

GSK3-mediated activation of the intrinsic apoptotic pathway and that UPR precedes mitochondrial dysfunction. The involvement of ER stress as a main effector mediating apoptosis and cell death in response to CsA treatment has also been demonstrated in a human proximal tubule cell model, thereby suggesting that a toxicity mechanism would be common to all species.

Activation of PI3K after CsA treatment appeared to trigger opposite effects. First, CsA induced PI3K-dependent activation of Akt, which mediated cellular responses against cell injury. Akt activation

led to transient phosphorylation and inhibition of the pro-apoptotic GSK3 β and Bad, thus preventing GSK3 β -mediated phosphorylation and activation of the pro-apoptotic Bax, and Bad-sequestering of Bcl-2. CsA-induced Akt activation could also promote p21 expression and cell cycle arrest, a situation that should allow vital repair to be carried out. Since CsA-triggered Akt phosphorylation is blocked by salubrinal and cycloheximide, PI3K activation should be located downstream of ER stress. Despite this initial pro-survival response, CsA-induced persistent damage overcame Akt-triggered pro-survival signals and PI3K-dependent caspase-9 activation sealed cell fate. These results suggest that different PI3K isoforms mediate CsA opposite effects. In fact, we previously described the expression of PI3K isoforms in PCT3 cells and the specific involvement of PI3K 110 α isoform in CsA-induced Akt phosphorylation (Sarro et al., 2008). Thus, the imbalance between the CsA-induced pro-death signal and pro-survival responses resulted in cell death. In this respect, the NF κ B-activated JAK-STAT pathway could also be involved in an initial pro-survival response, since inhibition of both pathways favored CsA-induced toxicity.

PKC has been involved in CsA-induced phenotypical changes. PKC β II mediates CsA-induced TGF β release and epithelial mesenchymal transition (EMT) in HK-2 cells (Slattery et al., 2005). We observed that, in PCT3 cells, the broad-spectrum PKC inhibitor GF109203X reduced LDH release and PARP cleavage in response to CsA, while the selective PKC β inhibitor, hispidin, was less effective. Our results suggest that PKC acts downstream of ER stress in CsA-induced toxicity, since GF109203X did not prevent GRP78 expression. Despite not playing a main role in CsA cytotoxic effects, PKC β II could be mediating some of the phenotypical changes induced by CsA in PCT3 cells. Our results show that CsA treatment induced the expression of PKC β II and activation of the TGF β downstream target SMAD2, with the latter being effectively prevented by the PKC β inhibitor. The responsiveness of these cells to TGF β was demonstrated by the fact that exogenously-added TGF β was able to induce the expression of the EMT marker α -SMA. Although CsA induces PKC β -mediated TGF β /SMAD2 activation, this pathway must not be involved in epithelial marker down-regulation and the phenotypical changes observed in PCT3 cells after CsA treatment, since the TGF β receptor inhibitor SB431542 was ineffective in preventing these effects and CsA was unable to induce α -SMA expression. Our results also indicate that ZO-1 but not E-cadherin down-regulation in response to CsA is at least partially mediated by MMPs, thereby suggesting that MMPs could also be participating in CsA-induced phenotypical changes. E-cadherin can be regulated at multiple levels, including protease cleavage, inhibition of newly synthesized E-cadherin transport to the cell surface, and

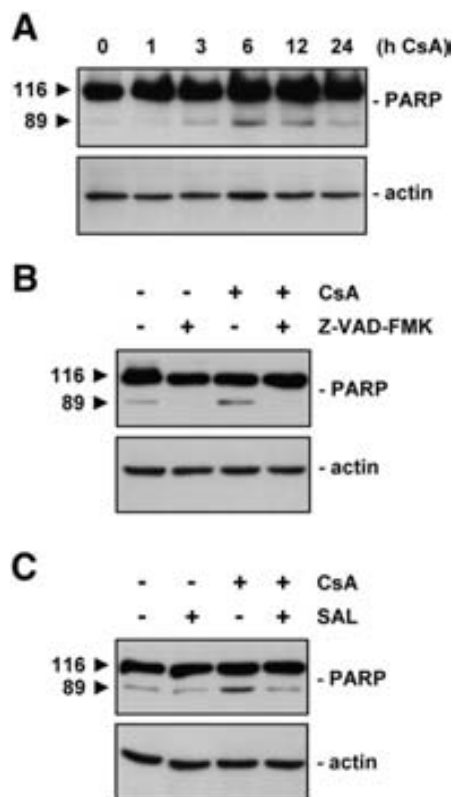


Fig. 9. CsA treatment induced ER stress-mediated apoptosis in human HK-2 cells. (A) HK-2 cells were treated with 20 μ M CsA for the indicated times and PARP cleavage was analyzed with an antibody that detects full-length human PARP1 (116 kDa), as well as the large fragment (89 kDa) resulting from caspase cleavage. (B and C) HK-2 cells were pre-treated with 50 μ M of the pan caspase inhibitor Z-VAD-FMK (B) or with 100 μ M of the protein synthesis inhibitor salubrinal (C) for 30 min before the addition of 20 μ M CsA for 6 h. PARP cleavage was analyzed as above.

transcriptional regulation, among others (van Roy and Berx, 2008). In this respect, it has been reported that in human renal epithelial cells (HRECs), CsA treatment down-regulates E-cadherin at the mRNA level and that pre-treatment with the ER stress inhibitor salubrinal restores E-cadherin mRNA expression (Pallet et al., 2008). It is noteworthy that MMPs inhibition afforded protection against CsA in PCT3 cells but not in HK-2 cells. It has been reported that CsA-induced up- or down-regulation of different MMPs subtypes seems to be cell specific (Esposito et al., 2000; Garvey et al., 2010; Zhou et al., 2007). While the effect of CsA on MMPs has been studied in the HK-2 cell line (McMorrow et al., 2005), nothing has been reported about MMPs in PCT3 cells. According to our results, we hypothesize that CsA might activate a different subset of MMPs in PCT3 than in HK-2 cells which, in turn, would be involved in CsA toxic effects.

MAPK inhibitors afforded partial protection against CsA toxicity. Activation of ERK in response to CsA has been previously described, and its activation has been related to a CsA-induced increase in trans-epithelial resistance and TGF β upregulation (Kiely et al., 2003). Activation of p38 and JNK is a common response to many forms of stress. Interestingly, protein synthesis blockade affected each MAPK in a specific manner. While both salubrinal and CHX prevented ERK activation, p38 was only blocked by salubrinal and activated by CHX. Finally, CsA-induced JNK activation was unaffected by both compounds.

To conclude, the present work provides wide screening of pharmaceuticals to characterize the signaling pathways involved in CsA toxicity in an *in vitro* model of proximal tubular cells. Targeted pathways were further analyzed by Western blot. As summarized in

Fig. 10, our results show ER stress to be one of the primary causes of CsA-induced cytotoxicity. Protein overload activates the pro-survival machinery in an attempt to rescue cell integrity. However, upon sustained CsA exposure, persistent damage overcomes this initial transient response, and mitochondrial-triggered apoptosis occurs in a process involving PI3K, MMPs, PKC and GSK3 pathways. Pharmacologic targeting of these pathways, with the different compounds used in this work, attenuates CsA toxicity in proximal tubule cells.

Supplementary materials related to this article can be found online at doi:10.1016/j.taap.2011.11.007.

Conflict of interest statement

The authors declare there are no conflicts of interest.

Acknowledgments

This work was supported in part by the Ministerio de Ciencia e Innovación [BFU2009-10183 and BFU2005-07573 to E.I. and SAF2005-05167 to A.M.], by the Instituto de Salud Carlos III [PI081351 to A.M.], by the Fundació La Marató de TV3 [002230 to A.M. and 002231 to E.I.] and by the Fundación Renal Iñigo Alvarez de Toledo, Fundación SENEFRO and Fundación Mutua Madrileña to A.M. Dr. Anna Meseguer's research group holds the Quality Mention from the Generalitat de Catalunya (2009SGR). We thank Cristine O'Hara for English revision.

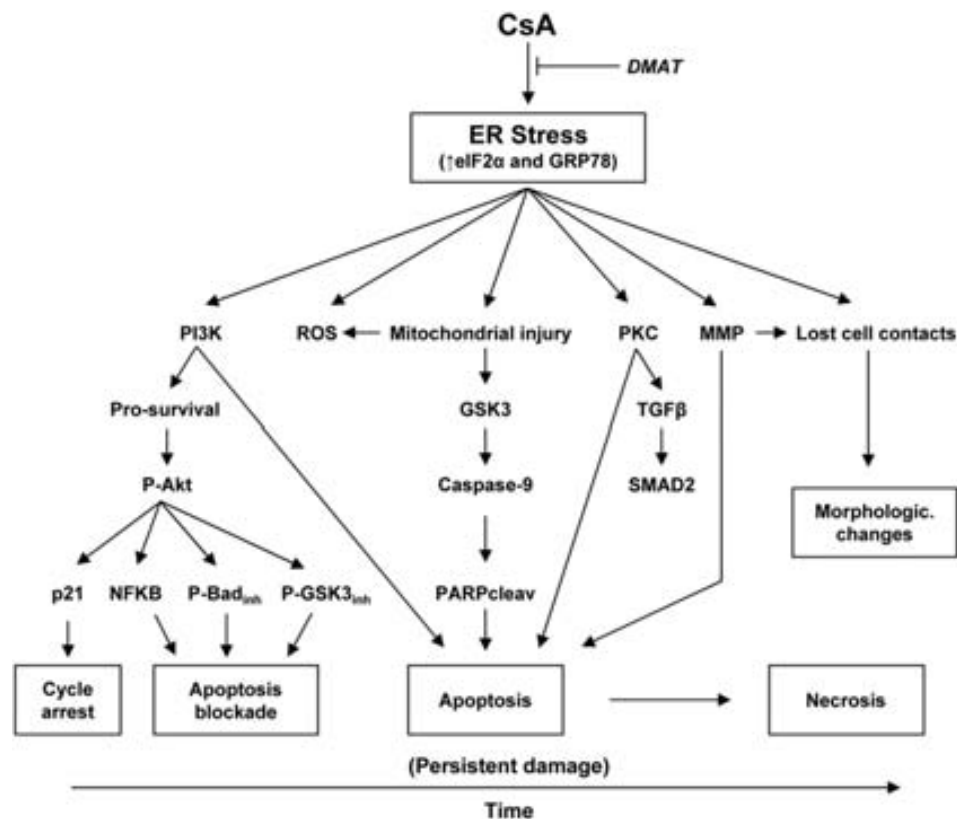


Fig. 10. Proposed mechanism of CsA-induced toxicity on PCT3 cells. Prolonged accumulation of unfolded proteins inside the ER lumen and subsequent ER stress would act as an early effector in CsA toxicity. Protein overload activates the pro-survival machinery in an attempt to rescue cell integrity. CsA induced Akt activation, which led to transient phosphorylation and inhibition of the pro-apoptotic GSK3 β and Bad. CsA-induced Akt activation could also promote NF κ B and p21 expression and cell cycle arrest, a situation that should allow vital repair to be carried out. However, upon sustained CsA exposure, persistent damage overcomes this initial transient response and mitochondrial-triggered apoptosis occurs in a process involving GSK3-mediated caspase-9 activation and PARP cleavage. MMPs, PKC and PI3K pathways would also be implicated in CsA-triggered apoptosis, thereby suggesting a dual role of PI3K activation in response to CsA. PKC-mediated SMAD2 activation seems not to be involved in the morphologic changes after CsA treatment. Increased ROS levels after CsA treatment might be a consequence of ER stress and might not be directly involved in cell death. CsA-induced morphological changes could be partially due to MMPs-triggered ZO-1 down-regulation. In a final step, apoptosis switches to another form of cell death, namely necrosis.

References

- Arany, I., Megyesi, J.K., Nelkin, B.D., Safirstein, R.L., 2006. STAT3 attenuates EGFR-mediated ERK activation and cell survival during oxidant stress in mouse proximal tubular cells. *Kidney Int.* 70, 669–674.
- Bernasconi, R., Solda, T., Galli, C., Pertel, T., Luban, J., Molinari, M., 2010. Cyclosporine A-sensitive, cyclophilin B-dependent endoplasmic reticulum-associated degradation. *PLoS One* 5.
- Bobadilla, N.A., Gamba, G., Tapia, E., Garcia-Torres, R., Bolio, A., Lopez-Zetina, P., Herrera-Acosta, J., 1998. Role of NO in cyclosporin nephrotoxicity: effects of chronic NO inhibition and NO synthases gene expression. *Am. J. Physiol.* 274, F791–F798.
- Burdmann, E.A., Andoh, T.F., Yu, L., Bennett, W.M., 2003. Cyclosporine nephrotoxicity. *Semin. Nephrol.* 23, 465–476.
- Cartier, N., Lacave, R., Vallet, V., Hagege, J., Hellio, R., Robine, S., Pringault, E., Cluzeaud, F., Briand, P., Kahn, A., et al., 1993. Establishment of renal proximal tubule cell lines by targeted oncogenesis in transgenic mice using the L-pyruvate kinase-SV40 (T) antigen hybrid gene. *J. Cell Sci.* 104 (Pt 3), 695–704.
- Cebrian, C., Areste, C., Nicolas, A., Olive, P., Carceller, A., Piulats, J., Meseguer, A., 2001. Kidney androgen-regulated protein interacts with cyclophilin B and reduces cyclosporine A-mediated toxicity in proximal tubule cells. *J. Biol. Chem.* 276, 29410–29419.
- Chassin, C., Bens, M., Vandewalle, A., 2007. Transimmortalized proximal tubule and collecting duct cell lines derived from the kidneys of transgenic mice. *Cell Biol. Toxicol.* 23, 257–266.
- Duncan, J.S., Gyenis, L., Lenehan, J., Bretner, M., Graves, L.M., Haystead, T.A., Litchfield, D.W., 2008. An unbiased evaluation of CK2 inhibitors by chemoproteomics: characterization of inhibitor effects on CK2 and identification of novel inhibitor targets. *Mol. Cell Proteomics* 7, 1077–1088.
- Esposito, C., Fornoni, A., Cornacchia, F., Bellotti, N., Fasoli, G., Foschi, A., Mazzucchelli, I., Mazzullo, T., Semeraro, L., Dal Canton, A., 2000. Cyclosporine induces different responses in human epithelial, endothelial and fibroblast cell cultures. *Kidney Int.* 58, 123–130.
- Franke, T.F., Hornik, C.P., Segev, L., Shostak, G.A., Sugimoto, C., 2003. PI3K/Akt and apoptosis: size matters. *Oncogene* 22, 8983–8988.
- Garvey, S.M., Sinden, D.S., Schoppee Bortz, P.D., Wamhoff, B.R., 2010. Cyclosporine upregulates Kruppel-like factor-4 (KLF4) in vascular smooth muscle cells and drives phenotypic modulation in vivo. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 333, 34–42.
- Ghee, J.Y., Han, D.H., Song, H.K., Kim, W.Y., Kim, S.H., Yoon, H.E., Choi, B.S., Kim, Y.S., Kim, J., Yang, C.W., 2008. The role of macrophage in the pathogenesis of chronic cyclosporine-induced nephropathy. *Nephrol. Dial. Transplant.* 23, 4061–4069.
- Han, S.W., Li, C., Ahn, K.O., Lim, S.W., Song, H.G., Jang, Y.S., Cho, Y.M., Jang, Y.M., Ghee, J.Y., Kim, J.Y., Kim, S.H., Kim, J., Kwon, O.J., Yang, C.W., 2008. Prolonged endoplasmic reticulum stress induces apoptotic cell death in an experimental model of chronic cyclosporine nephropathy. *Am. J. Nephrol.* 28, 707–714.
- Isern, J., Meseguer, A., 2003. Hormonal regulation and characterisation of the mouse Cyp4b1 gene 5'-flanking region. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 307, 139–147.
- Islam, M., Burke Jr., J.F., McGowan, T.A., Zhu, Y., Dunn, S.R., McCue, P., Kanalas, J., Sharma, K., 2001. Effect of anti-transforming growth factor-beta antibodies in cyclosporine-induced renal dysfunction. *Kidney Int.* 59, 498–506.
- Ito, H., Kasagi, N., Shomori, K., Osaki, M., Adachi, H., 1995. Apoptosis in the human allografted kidney. Analysis by terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated DUTP-biotin nick end labeling. *Transplantation* 60, 794–798.
- Jennings, P., Aydin, S., Bennett, J., McBride, R., Weiland, C., Tuite, N., Gruber, L.N., Perco, P., Gaora, P.O., Ellinger-Ziegelbauer, H., Ahr, H.J., Kooten, C.V., Daha, M.R., Prieto, P., Ryan, M.P., Pfaller, W., McMorrow, T., 2009. Inter-laboratory comparison of human renal proximal tubule (HK-2) transcriptome alterations due to Cyclosporine A exposure and medium exhaustion. *Toxicol. In Vitro* 23, 486–499.
- Jennings, P., Koppelstaetter, C., Aydin, S., Abberger, T., Wolf, A.M., Mayer, G., Pfaller, W., 2007. Cyclosporine A induces senescence in renal tubular epithelial cells. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 293, F831–F838.
- Justo, P., Lorz, C., Sanz, A., Egado, J., Ortiz, A., 2003. Intracellular mechanisms of cyclosporin A-induced tubular cell apoptosis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 14, 3072–3080.
- Kahan, B.D., 1993. Cyclosporine: the base for immunosuppressive therapy—present and future. *Transplant. Proc.* 25, 508–510.
- Kiely, B., Feldman, G., Ryan, M.P., 2003. Modulation of renal epithelial barrier function by mitogen-activated protein kinases (MAPKs): mechanism of cyclosporine A-induced increase in transepithelial resistance. *Kidney Int.* 63, 908–916.
- Kuypers, D.R., Neumayer, H.H., Fritsche, L., Budde, K., Rodicio, J.L., Vanrenterghem, Y., 2004. Calcium channel blockade and preservation of renal graft function in cyclosporine-treated recipients: a prospective randomized placebo-controlled 2-year study. *Transplantation* 78, 1204–1211.
- LaSpina, M., Tripathi, S., Gatto, L.A., Bruch, D., Maier, K.G., Kittur, D.S., 2008. An interleukin-6-neutralizing antibody prevents cyclosporine-induced nephrotoxicity in mice. *J. Surg. Res.* 148, 121–125.
- Malhotra, J.D., Kaufman, R.J., 2007. Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress: a vicious cycle or a double-edged sword? *Antioxid. Redox Signal.* 9, 2277–2293.
- McMorrow, T., Gaffney, M.M., Slattery, C., Campbell, E., Ryan, M.P., 2005. Cyclosporine A induced epithelial–mesenchymal transition in human renal proximal tubular epithelial cells. *Nephrol. Dial. Transplant.* 20, 2215–2225.
- Mihatsch, M.J., Thiel, G., Ryffel, B., 1988. Histopathology of cyclosporine nephrotoxicity. *Transplant. Proc.* 20, 759–771.
- Myers, B.D., Ross, J., Newton, L., Luetscher, J., Perlrath, M., 1984. Cyclosporine-associated chronic nephropathy. *N. Engl. J. Med.* 311, 699–705.
- Neria, F., Castilla, M.A., Sanchez, R.F., Gonzalez Pacheco, F.R., Deudero, J.J., Calabia, O., Tejedor, A., Manzarbeitia, F., Ortiz, A., Caramelo, C., 2009. Inhibition of JAK2 protects renal endothelial and epithelial cells from oxidative stress and cyclosporin A toxicity. *Kidney Int.* 75, 227–234.
- Pagano, M.A., Bain, J., Kazimierczuk, Z., Sarno, S., Ruzzene, M., Di Maira, G., Elliott, M., Orzeszko, A., Cozza, G., Meggio, F., Pinna, L.A., 2008. The selectivity of inhibitors of protein kinase CK2: an update. *Biochem. J.* 415, 353–365.
- Pagano, M.A., Poletto, G., Di Maira, G., Cozza, G., Ruzzene, M., Sarno, S., Bain, J., Elliott, M., Moro, S., Zagotto, G., Meggio, F., Pinna, L.A., 2007. Tetrabromocinnamic acid (TBCA) and related compounds represent a new class of specific protein kinase CK2 inhibitors. *ChemBioChem* 8, 129–139.
- Pallet, N., Anglicheau, D., 2009. Autophagy: a protective mechanism against nephrotoxicant-induced renal injury. *Kidney Int.* 75, 118–119 author reply 119.
- Pallet, N., Bouvier, N., Bendjallab, A., Rabant, M., Flinois, J.P., Hertig, A., Legendre, C., Beaune, P., Thervet, E., Anglicheau, D., 2008. Cyclosporine-induced endoplasmic reticulum stress triggers tubular phenotypic changes and death. *Am. J. Transplant.* 8, 2283–2296.
- Papachristou, E., Papadimitropoulos, A., Kotsantis, P., Goumenos, D.S., Katsoris, P.G., Vlachojannis, J.G., 2009. Cyclosporine induces endothelin-1 mRNA synthesis and nitric oxide production in human proximal tubular epithelial cell cultures. *Ren. Fail.* 31, 372–376.
- Pfaller, W., Gstraunthaler, G., 1998. Nephrotoxicity testing in vitro—what we know and what we need to know. *Environ. Health Perspect.* 106 (Suppl. 2), 559–569.
- Puigmule, M., Lopez-Hellin, J., Sune, G., Tornavaca, O., Camano, S., Tejedor, A., Meseguer, A., 2009. Differential proteomic analysis of cyclosporine A-induced toxicity in renal proximal tubule cells. *Nephrol. Dial. Transplant.* 24, 2672–2686.
- Rezzani, R., 2006. Exploring cyclosporine A-side effects and the protective role-played by antioxidants: the morphological and immunohistochemical studies. *Histol. Histopathol.* 21, 301–316.
- Ryan, M.J., Johnson, G., Kirk, J., Fuerstenberg, S.M., Zager, R.A., Torok-Storb, B., 1994. HK-2: an immortalized proximal tubule epithelial cell line from normal adult human kidney. *Kidney Int.* 45, 48–57.
- Sarro, E., Tornavaca, O., Plana, M., Meseguer, A., Itarte, E., 2008. Phosphoinositide 3-kinase inhibitors protect mouse kidney cells from cyclosporine-induced cell death. *Kidney Int.* 73, 77–85.
- Shang, M.H., Yuan, W.J., Zhang, S.J., Fan, Y., Zhang, Z., 2008. Intrarenal activation of renin angiotensin system in the development of cyclosporine A induced chronic nephrotoxicity. *Chin. Med. J. (Engl)* 121, 983–988.
- Shihab, F.S., Andoh, T.F., Tanner, A.M., Yi, H., Bennett, W.M., 1999. Expression of apoptosis regulatory genes in chronic cyclosporine nephrotoxicity favors apoptosis. *Kidney Int.* 56, 2147–2159.
- Slattery, C., Campbell, E., McMorrow, T., Ryan, M.P., 2005. Cyclosporine A-induced renal fibrosis: a role for epithelial–mesenchymal transition. *Am. J. Pathol.* 167, 395–407.
- Sugeno, N., Takeda, A., Hasegawa, T., Kobayashi, M., Kikuchi, A., Mori, F., Wakabayashi, K., Itoyama, Y., 2008. Serine 129 phosphorylation of alpha-synuclein induces unfolded protein response-mediated cell death. *J. Biol. Chem.* 283, 23179–23188.
- Sun, X.M., MacFarlane, M., Zhuang, J., Wolf, B.B., Green, D.R., Cohen, G.M., 1999. Distinct caspase cascades are initiated in receptor-mediated and chemical-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 274, 5053–5060.
- Szegezdi, E., Logue, S.E., Gorman, A.M., Samali, A., 2006. Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO Rep.* 7, 880–885.
- van Roy, F., Bexx, G., 2008. The cell–cell adhesion molecule E-cadherin. *Cell. Mol. Life Sci.* 65, 3756–3788.
- Xiao, Z., Li, C., Shan, J., Luo, L., Feng, L., Lu, J., Li, S., Long, D., Li, Y., 2011. Mechanisms of renal cell apoptosis induced by cyclosporine A: a systematic review of in vitro studies. *Am. J. Nephrol.* 33, 558–566.
- Yoon, H.E., Ghee, J.Y., Piao, S., Song, J.H., Han, D.H., Kim, S., Ohashi, N., Kobori, H., Kuro-o, M., Yang, C.W., 2011. Angiotensin II blockade upregulates the expression of Klotho the anti-ageing gene, in an experimental model of chronic cyclosporine nephropathy. *Nephrol. Dial. Transplant.* 26 (3), 800–813.
- Zhou, W.H., Du, M.R., Dong, L., Zhu, X.Y., Yang, J.Y., He, Y.Y., Li, D.J., 2007. Cyclosporin A increases expression of matrix metalloproteinase 9 and 2 and invasiveness in vitro of the first-trimester human trophoblast cells via the mitogen-activated protein kinase pathway. *Hum. Reprod.* 22, 2743–2750.