



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias

Profesor Patrocinante

Dra. María Cecilia Rauch Briceño

Instituto de Bioquímica y Microbiología

Facultad de Ciencias

ACTIVACIÓN DE RECEPTOR DE TGF- β Y EXPRESIÓN DE FKBP12 EN CÉLULAS HK-2 TRATADAS CON TACROLIMUS

Tesis de Grado presentada como parte de los requisitos para optar al grado de *Licenciado en Bioquímica* y Título Profesional de *Bioquímico*

LUZ MARÍA FUENTEALBA PÉREZ

VALDIVIA – CHILE

2015

*A mi familia, a mis padres,
a Pablo y a mis hijos.*

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer en primer lugar a quien me ha acompañado desde temprano en este camino, dándome su apoyo, paciencia, confianza, comprensión y sobre todo independencia, a mi profesora Dra. Cecilia Rauch, cuyos conocimientos y experiencias me han ayudado a crecer como profesional y como persona. También quisiera agradecer a los demás profesores que de una u otra forma han aportado en mi desarrollo como profesional, especialmente al Dr. Alejandro Yañez por su colaboración e integración dentro del laboratorio y al Dr. Alejandro Claude por ser un modelo de seriedad, responsabilidad y rigor.

Al grupo de laboratorio AYC y MCR quienes han sido un gran aporte en esta etapa, grandiosas personas que hacen que el día a día sea más grato. Especialmente a Pamela Silva que ha cooperado constantemente a lo largo de esta investigación y a Rodrigo Sandoval que ha sido tanto maestro como muy buen amigo. A los viejos y a los nuevos del laboratorio, a quiénes se han terminado su estadía y quiénes la terminarán pronto. Fue una increíble experiencia el trabajar con todos ustedes.

Quiero resaltar la labor de toda mi familia, que ha sido el pilar fundamental en mi desarrollo personal y juntos han hecho posibles mis pretensiones de ser científica. Particularmente agradezco a mis primos, que siempre están dispuestos a dar una mano. A quiénes se han sacrificado por verme feliz: mi madre, que me ha enseñado desde pequeña el valor del conocimiento, mi padre, que me ha mostrado el valor de salir adelante pese a todas las dificultades, mi hermano, camarada de toda la vida y mis abuelos Laura y Juan, con ellos cuento incondicionalmente. También estoy muy

agradecida de la familia de mi marido por todo su apoyo y ayuda, en especial a Roberto Bravo que aportó directamente en la revisión de este escrito. Finalmente, agradezco a Pablo, mi amor y compañero, que junto con mis hijos Emilio y Gaspar me han brindado la motivación y energía que me permitieron terminar este proyecto.

Esta tesis fue financiada por los proyectos: Proyecto DID-UACH S-2012-58 (Dra. María Cecilia Rauch) y Proyecto FONDECYT 1090694 (Dr. Alejandro Yañez)

INDICE GENERAL

1. RESUMEN	1
1.1 SUMMARY	2
2. INTRODUCCIÓN	3
2.1 La Respuesta inmunitaria	3
2.2 Inmunosupresión	5
2.2.1 Tacrolimus (FK506)	8
2.2.2 Rapamicina (Sirolimus, SRL)	10
2.3 FKBP (FK506 Binding Proteins)	11
2.3.1 Clasificación de FKBP	12
2.3.2 FKBP12	14
2.4 Factor de Crecimiento Transformante β (TGF- β).....	16
2.4.1 Receptor de Factor de Crecimiento Transformante β (T β R)	17
2.5 Propuesta de trabajo	20
2.5.1 Hipótesis de trabajo	21
2.5.2 Objetivos generales	21
2.5.3 Objetivos específicos	21

3. MATERIALES Y MÉTODOS	22
3.1 Materiales	22
3.1.1 Material Biológico	22
3.1.1.1 Cultivo celular	22
3.1.2 Materiales Químicos	22
3.1.3 Equipos	24
3.2 Métodos	25
3.2.1 Cultivo celular	25
3.2.2 Tratamiento de las células	26
3.2.3 Extracción de proteínas totales	26
3.2.4 Cuantificación de proteínas totales	27
3.2.5 Separación de proteínas por SDS-PAGE	27
3.2.6 Transferencia de proteínas a membranas de PVDF	27
3.2.7 Inmunodetección por Western blot	28
3.2.8 Revelado de las membranas	28
3.2.9 Extracción de ARN	29

3.2.10 Reacción de la polimerasa en cadena acoplada a transcripción reversa (RT-PCR)	30
3.2.11 Análisis densitométrico	31
3.2.12 Análisis estadístico	31
4. RESULTADOS	32
4.1 Efecto de FK506 y SRL en la activación del Receptor de TGF- β	32
4.2 Efecto de FK506 y SRL en la expresión de FKBP12	38
4.3 Efecto de FK506 y SRL en los niveles proteicos de FKBP12	43
5. DISCUSIÓN	48
6. REFERENCIAS	60

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Mecanismo utilizado por fármacos inmunosupresores	6
Figura 2: Esquema de dominios estructurales de 15 FKBP _s humanas	13
Figura 3: Modelo de inhibición del receptor de TGF- β por FKBP12	19
Figura 4: Efecto de FK506 y SRL en la activación de T β R a 4 horas de tratamiento. ...	34
Figura 5: Efecto de FK506 y SRL en la activación de T β R a distintos tiempos	36
Figura 6: Efecto de FK506 y SRL en la expresión de FKBP12.....	39
Figura 7: Efecto de FK506 y SRL en la expresión génica de FKBP12 a distintos tiempos	42
Figura 8: Efecto de FK506 y SRL en la proteína FKBP12	44
Figura 9: Efecto de FK506 y SRL en los niveles de proteína FKBP12	46
Figura 10: Esquema de posible mecanismo nefrotóxico inducido por FK506 activando la vía de TGF- β /Smad	58

LISTA DE ABREVIATURAS

APC	Células presentadoras de antígeno
AZA	Azatioprina
BFA	Brefeldina A
BIG1	GEF inhibido por brefeldina A 1
BSA	Albúmina Sérica de Bovino
CaN	Calcineurina
CD20	Cluster of differentiation 20 (Cúmulo de diferenciación 20)
CD3	Cluster of differentiation 3 (Cúmulo de diferenciación 3)
CsA	Ciclosporina A
Cy	Ciclofosfamida
CYP450	Citocromo P450
DAG	Diacilglicerol
DCB	Dominio de dimerización y unión a ciclofilinas
EGF	Factor de crecimiento epidermal
EMSA	Ensayo de cambio de movilidad electroforética
ETS	Virus de eritroblastosis v-ets E26 de aves
FK506	Tacrolimus
FKBD	Dominio de unión a FK506
FKBP	FK506 Binding Protein (Proteína de unión a FK506)
FKBP12	FK506 Binding Protein 12 (Proteína de unión a FK506 12)
FKBP12.6	FK506 Binding Protein 12.6 (Proteína de unión a FK506 12.6)
FKBP13	FK506 Binding Protein 13 (Proteína de unión a FK506 13)

FKBP135	FK506 Binding Protein 135 (Proteína de unión a FK506 135)
FKBP19	FK506 Binding Protein 19 (Proteína de unión a FK506 19)
FKBP22	FK506 Binding Protein 22 (Proteína de unión a FK506 22)
FKBP25	FK506 Binding Protein 25 (Proteína de unión a FK506 25)
FKBP36	FK506 Binding Protein 36 (Proteína de unión a FK506 36)
FKBP38	FK506 Binding Protein 38 (Proteína de unión a FK506 38)
FKBP51	FK506 Binding Protein 51 (Proteína de unión a FK506 51)
FKBP52	FK506 Binding Protein 52 (Proteína de unión a FK506 52)
FKBP65	FK506 Binding Protein 65 (Proteína de unión a FK506 65)
GEF	Factor intercambiador de nucleótidos de guanina
GM-CSF	Factor Estimulador de Colonias de Granulocitos Macrófagos
GS	Dominio rico en glicinas y serinas
HK-2	Human Kidney 2 (Células de Túbulo proximal de riñón humano)
IFN	Interferón
IgG	Inmunoglobulina G
IL-2	Interleuquina 2
IL-2R	Receptor de IL-2
IL-3	Interleuquina 3
IL-4	Interleuquina 4
IP3	Inositol 1,4,5-trifosfato
K_d	Constante de disociación
LAP	Péptido asociado a la latencia
LLC	Complejo latente grande

LTBP	Proteína de unión a TGF- β latente
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
MMF	Micofenolato mofetil
mTOR	Mammalian target of Rapamycin (Objetivo de Rapamicina mamífero)
mTORC1	Complejo mTOR 1
mTORC2	Complejo mTOR 2
NFAT	Factor nuclear de células T activadas
Nox4	NADPH oxidasa 4
OKT3	Anticuerpo monoclonal dirigido a CD3 (Muromonab-CD3)
PKC	Proteína Quinasa C
PPIasa	Peptidil prolil isomerasa
RE	Retículo Endoplasmático
RT-PCR	Transcripción reversa acoplada a la reacción de la polimerasa en cadena
RyR	Receptor de Rianodina
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones denaturantes
SFB	Suero fetal bovino
SLC	Complejo latente pequeño
SRL	Rapamicina, Sirolimus
TASSER	Threading/ASSEMBly/Refinement (Enhebrado/Ensamblaje/Refinamiento)

TCR	Receptor de célula T
TF	Factor de Transcripción
TGF- β	Factor de crecimiento transformante beta (transforming growth factor beta)
TGN46	Proteína integral de membrana de la red <i>Trans</i> de Golgi
TNF- α	Factor de necrosis tumoral α
TPR	Repeticiones tetratricopéptidos
T β R	Receptor de TGF- β
VSMC	Células vasculares de músculo liso

1. RESUMEN

Tacrolimus (FK506) es un inmunosupresor ampliamente estudiado y de mucha eficacia al ser utilizado en terapias de trasplantes o enfermedades autoinmunes. Su mecanismo de acción inhibitorio de la respuesta inmunitaria está bien caracterizado pero no permite explicar las consecuencias asociadas a su uso. Una secuela importante es la nefrotoxicidad crónica en la que destacan efectos fibrogénicos con aumentos considerables de la expresión de TGF- β . Esta es una citoquina muy importante, ampliamente expresada en nuestro organismo, que actúa a través de sus receptores de membrana (T β R), induciendo señalizaciones a través de Smad2/3. Específicamente, T β RI se encuentra regulado por FKBP12, la que bloquea su activación. Rapamicina (SRL) es un inmunosupresor que se une a FKBP12 en el mismo bolsillo molecular que FK506, pero no ejerce el mismo mecanismo de acción ni efectos secundarios.

En base a estos antecedentes el objetivo de esta investigación fue comparar la variación en la fosforilación de Smad2/3 y expresión de FKBP12 en células HK-2 tratadas con FK506 o SRL. A través de inmunodetecciones observamos que ambos fármacos fueron capaces de aumentar p-Smad2/3, siendo el aumento por FK506 más notorio que por SRL. Además, se demostró que los dos inmunosupresores disminuyen la expresión génica de FKBP12 y aumentan sus niveles proteicos a distintos tiempos en células renales de túbulo proximal HK-2. Esta investigación sugiere que FK506 secuestra a FKBP12 lo que provoca una activación de T β R sin presencia de ligando. Esperamos seguir investigando sobre otros mecanismos de FK506 que puedan explicar sus efectos secundarios, como el bloqueo de la vía de secreción de proteínas.

1.1 SUMMARY

Tacrolimus (FK506) is an immunosuppressant drug widely studied and very effective in transplant therapies or autoimmune diseases. The action mechanism that inhibits the immune response; which starts with binding of its intracellular receptor FKBP12, it is well characterized but it does not explain the side effects associated to this treatment. An important side effect is chronic nephrotoxicity highlighting fibrogenic effects with significant increases in TGF- β expression. TGF- β is an important cytokine extensively expressed in secretory human tissues, it acts through its membrane receptors (T β R), leading signaling through Smad2/3. Specifically, T β RI is regulated by FKBP12, blocking its activation. Rapamycin (SRL) is an immunosuppressant drug that binds FKBP12 in the same molecular pocket FK506 does, however SRL neither perform the same mechanism of action nor side effects.

Based on this background, the focus of this investigation was to compare variation on Smad2/3 phosphorylation and FKBP12 expression in HK-2 cell treated with FK506 or SRL. Through immunodetections we noticed that both drugs were able to increase p-Smad2/3, being FK506 treatment the most significant. Also we showed that both immunosuppressant drugs decreased FKBP12 gene expression and both increased FKBP12 protein level in proximal tubular cell, HK-2. This research suggests FK506 abducts FKBP12 and provoke T β R activation without ligand presence. We hope to keep looking additional evidence that allows explaining its side effects, like blockage of the secretory pathway.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 La respuesta inmunitaria

El sistema inmunitario se compone de una red de proteínas, células, tejidos y órganos que trabajan en conjunto para proteger al organismo de sustancias potencialmente nocivas, que pueden ser moléculas tóxicas, partes de un patógeno e incluso proteínas del propio organismo, denominadas antígenos, así como de microorganismos causantes de daño. La labor del sistema inmunitario se divide en dos grandes procesos: la respuesta inmunitaria innata y la respuesta inmunitaria adquirida. La primera se refiere a una labor rápida e inespecífica, que evita que los antígenos y patógenos ingresen en el organismo a través de barreras que incluyen la piel, el reflejo de la tos, el ácido gástrico, las mucosidades, entre otras. Por su parte, la respuesta inmunitaria adquirida se construye a partir de la exposición a antígenos una vez que éste ha traspasado las barreras inespecíficas, esta exposición gatilla una serie de procesos celulares específicos que llevan a la destrucción o inactivación del antígeno. Esta señal de reconocimiento que posee el antígeno permite que se destruyan elementos más complejos, por ejemplo, una bacteria será destruida porque se reconoce como antígeno alguna de sus proteínas de superficie (Abbas *et al.*, 2012).

La capacidad de reconocimiento de antígenos que tiene el sistema inmunitario, se debe fundamentalmente a que es capaz de diferenciar elementos nocivos al

organismo de elementos inofensivos (Matzinger, 2002). Sin embargo, este reconocimiento específico puede ser una desventaja, por ejemplo, en el caso de los trasplantes, pues al tratarse de un órgano foráneo presenta antígenos que lo señalan como nocivo, haciéndolo susceptible a la destrucción por parte del sistema inmunitario del huésped. Otra situación similar ocurre cuando el sistema inmunitario se descontrola, reconociendo elementos propios como si fuesen antígenos, intentando destruirlos, por ejemplo en artritis reumatoide se producen anticuerpos contra la inmunoglobulina G. Este tipo de anomalías da origen a las enfermedades autoinmunes. Para ambos casos, la estrategia que se utiliza es disminuir la respuesta inmunitaria del paciente, de tal forma que no sea capaz de reconocer o de destruir el órgano. Dentro de las primeras estrategias terapéuticas para conseguir la supresión del sistema inmunitario, se encuentra el uso de cortisona, utilizada por primera vez a mediados del siglo XX como tratamiento para la artritis reumatoide (Boland y Headley, 1949). La cortisona es una hormona del grupo de los corticoides que provocan un efecto similar a las hormonas que producen las glándulas suprarrenales para combatir el estrés, incluyendo la supresión del sistema inmunitario y la respuesta inflamatoria.

Las células presentadoras de antígenos (*Antigen-Presenting Cells, APC*), por ejemplo las células dendríticas, son las encargadas de reconocer, internalizar y procesar patógenos que atraviesan las barreras del sistema inmunitario innato, exponiendo sus fragmentos en la membrana. Al exteriorizar los antígenos, las APC son ayudadas por las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (*Major Histocompatibility Complex, MHC*), las cuales interaccionan con el antígeno para presentarlo en la superficie celular (Janeway *et al.*, 2001). Esta señal es reconocida por

las células regulatorias de la respuesta adaptativa, los linfocitos, en una estructura denominada Sinapsis Inmunológica. En esta sinapsis el MHC asociado al antígeno es reconocido por el receptor de linfocitos T (*T-Cell Receptor*, TCR), el cual es único para cada fragmento antigénico. La señal se transmite entonces dentro de la célula, se produce un aumento de calcio lo que permite la activación de Calcineurina (CaN). Esta fosfatasa cataliza la desfosforilación del factor nuclear de células T activadas (*Nuclear Factor of Activated T-Cells*, NFAT), quien transloca al núcleo y activa la transcripción de una serie de citoquinas como Interleuquinas (IL-2, IL-3, IL-4), Factor Estimulador de Colonias de Granulocitos Macrófagos (*Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor*, GM-CSF), Factor de Necrosis Tumoral α (*Tumor Necrosis Factor α* , TNF- α), Interferón (IFN), entre otras (Reem *et al.*, 1983; Elliott *et al.*, 1984; Tocci *et al.*, 1989; Yoshida *et al.*, 1998). La IL-2 es reconocida por su receptor (IL-2R) en células T iniciando la transducción de señal que activa al complejo mTORC (*mammalian Target of Rapamycin Complex*) promoviendo la fosforilación y activación de una serie de señales que en conjunto aumentan la proliferación (Liao *et al.*, 2011).

2.2 Inmunosupresión

Los fármacos inmunosupresores revolucionaron el trasplante de órganos a medida que se fueron descubriendo y estudiando (**Figura 1**). Actualmente existen varios tipos y se clasifican respecto a su mecanismo de acción en 5 grupos: (I) Reguladores de la expresión génica; (II) Agentes alquilantes; (III) Inhibidores de la

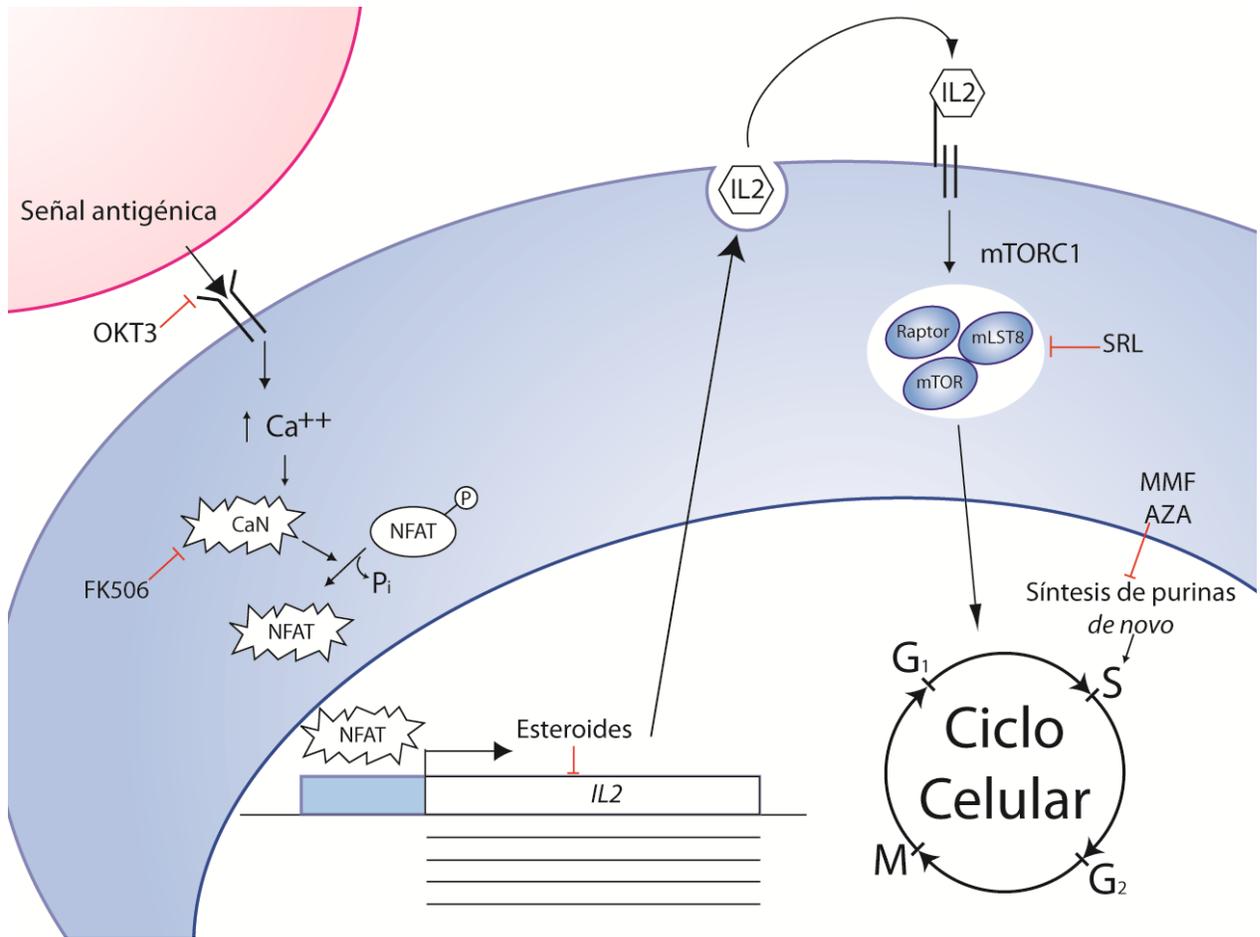


Figura 1: Mecanismo utilizado por fármacos inmunosupresores. La presentación de antígenos por las APC se ve bloqueada por agentes biológicos como OKT3. El reconocimiento del antígeno produce una transducción de señales que se ve interrumpida por Anticalcineurínicos como FK506 (Tacrolimus). Río abajo de esta señalización, los esteroides bloquean la transcripción del gen de IL-2. SRL (Rapamicina) inhibe la vía de señalización de IL-2 bloqueando la actividad de mTORC1, mientras que MMF (Micofenolato Mofetil) y AZA (Azatioprina) impiden la síntesis *de novo* de purinas, interrumpiendo la etapa final de la respuesta inmunitaria.

síntesis *de novo* de purinas; (IV) Inhibidores de la síntesis *de novo* de pirimidinas; (V) Inhibidores de quinasas y fosfatasa (Allison, 2000).

Los fármacos inmunosupresores más utilizados en Chile son los corticoides, que pertenecen al primer grupo. Su mecanismo de acción se basa en la inhibición de genes, principalmente inhibe la expresión de IL-2, la cual es clave para la respuesta inmunitaria adquirida ya que participa en la activación de los linfocitos (Liao *et al.*, 2011). Ciclofosfamida (Cy) es un representante del segundo grupo, en este caso, los fragmentos que genera la enzima CYP450 al metabolizar la ciclofosfamida, son capaces de generar entrecruzamientos en las cadenas de ADN condicionando la muerte celular y suprimiendo la respuesta inmunitaria (Chabner *et al.*, 1996). Micofenolato Mofetil (MMF) y Azatioprina (AZA) son inhibidores de la síntesis *de novo* de nucleótidos. La mayoría de las células poseen dos vías de síntesis de nucleótidos, una de salvataje y otra *de novo*. Una excepción son los linfocitos T activados, los cuales no poseen la vía de salvataje y utilizan exclusivamente la síntesis *de novo*. Debido a ello, tanto MMF como AZA funcionan ejerciendo su acción principalmente en este tipo celular inhibiendo así la respuesta inmunitaria (Maltzman y Koretzky, 2003). Ciclosporina A (CsA) pertenece al quinto grupo por su acción inhibitoria de la fosfatasa Calcineurina gracias a una proteína intracelular que actúa como receptor del fármaco denominada ciclofilina. Calcineurina también es inhibida por Tacrolimus (FK506), que utiliza un mecanismo similar a CsA pero se une a la inmunofilina 12 (FKBP12, *FK506-Binding Protein 12*), otro receptor intracelular de la misma familia de ciclofilinas, pero que posee funciones diferentes. Ambos fármacos previenen la producción de IL-2 (Liu *et al.*, 1991). Cabe destacar que otro inmunosupresor importante es Rapamicina o

Sirolimus (SRL) que al igual que FK506 se une a FKBP12, pero no inhibe la fosfatasa, sino que inhibe con alta especificidad la quinasa mTOR (*mammalian Target Of Rapamycin*) lo que bloquea la transducción de señales en respuesta a IL-2 (Abraham y Wiedderecht, 1996).

En los últimos años ha surgido un nuevo grupo de fármacos, denominado “agentes biológicos”. Este grupo incluye anticuerpos desarrollados para inhibir algún receptor. Por ejemplo, Rituximab es un anticuerpo que reconoce la molécula CD20 (Maloney *et al.*, 1997), Infliximab bloquea el receptor de TNF- α (Knight *et al.*, 1993) y OKT3 se une y bloquea a la molécula CD3 que se encuentra interactuando con el receptor de antígenos en los linfocitos T (Norman, 1995).

2.2.1 Tacrolimus (FK506)

Actualmente, Tacrolimus es el inhibidor de Calcineurina más ampliamente utilizado, tanto para el trasplante hepático (Martin *et al.*, 2004) como para trasplantes renales, donde el 86% de los pacientes de trasplantes renales son tratados con este fármaco (Andreoni *et al.*, 2007; Axelrod *et al.*, 2010).

Tacrolimus o FK506 es un macrólido descubierto en 1987 por un grupo japonés, a partir de una bacteria llamada *Streptomyces tsukubaensis* (Kino *et al.*, 1987). Su efecto inmunosupresor lo realiza a través de su unión a FKBP12, complejo que se une a Calcineurina e impide su acción (Fruman *et al.*, 1992), inhibiendo por consiguiente los eventos dependientes de esta señal como la expresión de IL-2 (Yoshida *et al.*, 1998).

Esta vía de acción se encuentra bien caracterizada, pero no permite explicar los efectos secundarios que manifiesta el uso de este fármaco (Fischereder y Kretzler, 2004).

Para FK506 se han descrito efectos diabetogénicos (Drachenberg *et al.*, 1999; Hoitsma y Hilbrands, 2006), neurológicos (Wijdicks *et al.*, 1995; Wijdicks *et al.*, 1999; Wong *et al.*, 1999; Jain *et al.*, 2000) y nefrotóxicos (Bennett *et al.*, 1996; Myers *et al.*, 1984). Dentro de estos, la nefrotoxicidad crónica afecta entre 10% a 40% de los pacientes con trasplante renal (First *et al.*, 1994; Vincenti *et al.*, 1996) y entre 18% a 43% de pacientes con trasplante de hígado (Platz *et al.*, 1994; Alessiani *et al.*, 1993; Porayko *et al.*, 1994), manifestándose por insuficiencia renal y/o hipertensión arterial (Morales *et al.*, 2001).

El efecto de Tacrolimus en el riñón ha sido ampliamente estudiado, pero aún no se conoce el mecanismo de su nefrotoxicidad. Una de las lesiones más importantes asociadas a la nefrotoxicidad por FK506 es la fibrosis intersticial (Roos-van Groningen *et al.*, 2006), donde se observa un marcado aumento tanto de colágeno como de otros marcadores fibróticos y un aumento considerable de la expresión de TGF- β (Khanna *et al.*, 2002). Se han visto acciones antiproliferativas en el epitelio tubular renal (McCauley *et al.*, 1991), daño en el endotelio, aumento de agregación plaquetaria y daño en la vía fibrolítica (Shaw *et al.*, 1996).

En relación a los mecanismos de acción descritos de Tacrolimus que podrían explicar sus efectos secundarios, se ha observado que produce un bloqueo parcial en la vía secretoria de proteínas (Rauch *et al.*, 2009; Cutiño, 2011; Sandoval, 2014). En este tipo de estudios se ha utilizado Brefeldina A para comparar el bloqueo de secreción de

proteínas por FK506 en diversos tipos celulares. Brefeldina A (BFA) produce un efecto bien caracterizado, causa un desensamblaje del complejo de Golgi y una redistribución de las proteínas residentes de éste, esto provoca la inhibición de la secreción de proteínas (Klausner *et al.*, 1992; Pelham, 1991), razón por la cual es una herramienta útil para comparar este efecto.

2.2.2 Rapamicina (Sirolimus, SRL)

FKBP12 también es receptor de Rapamicina o Sirolimus (SRL), que fue descubierto en 1975 como un novedoso antibiótico y antimicótico. Es producido por *Streptomyces hygroscopicus* aislada de la isla Rapa Nui, de allí el nombre del fármaco (Sehgal *et al.*, 1975; Baker *et al.*, 1978). Este macrólido es similar a Tacrolimus y se une al mismo sitio en FKBP12, pero no inhibe a Calcineurina (Dumont *et al.*, 1990). Al unirse a FKBP12 el complejo se une a la quinasa mTOR e inhibe su acción (Bierer *et al.*, 1990; Hay y Sonenberg, 2004). La proteína mTOR es una serina/treonina quinasa presente en dos grandes complejos (mTORC1 y mTORC2), donde sólo el complejo 1 es inhibido por Rapamicina (Abraham, 1998).

En la respuesta inmunitaria, una de las funciones más importantes de mTORC1 es participar en la transducción de señales en respuesta a la activación del receptor de IL-2 (Liao *et al.*, 2011), fosforilando otros factores que en conjunto permiten el paso del ciclo celular de G1 a S. La acción de Rapamicina inhibiendo a mTOR previene el avance del ciclo celular, bloqueando así la proliferación y por ende la respuesta inmunitaria (Dumont *et al.*, 1990; Bierer *et al.*, 1990).

El tratamiento con Sirolimus presenta bastantes efectos secundarios, principalmente produce efectos respiratorios (Sola *et al.*, 2006), metabólicos (Alkhatib, 2006) y cardiovasculares (Wheatcroft *et al.*, 2006) que difieren de los efectos de Tacrolimus. En el riñón, se han reportado propiedades benéficas importantes, como disminuir y prevenir la fibrosis renal (Ozdemir *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2014).

2.3 FKBP (FK506 Binding Proteins)

Como se mencionó previamente, Tacrolimus y Rapamicina se unen a proteínas llamadas FKBP o inmunofilinas (*FK506 Binding Proteins*) (Bierer *et al.*, 1990; Schreiber, 1991), las cuales pertenecen a una familia de proteínas altamente conservada llamadas ciclofilinas, por su capacidad de unir fármacos inmunosupresores (Galat, 2003).

La mayoría de las FKBP son capaces de unir FK506 y muestran actividad Peptidil Prolil cis/trans Isomerasa (PPIasa) (Harding *et al.*, 1989; Siekierka *et al.*, 1989). Se caracterizan por tener un dominio de unión a FK506 llamado FKBD (*FK506 Binding Domain*) que además es responsable de la actividad PPIasa. Algunas FKBP poseen sólo un dominio FKBD, como FKBP12, y otras poseen dominios adicionales con otras funciones como chaperonas, o dominios de localización subcelular, por ejemplo dominios de transmembrana en el caso de FKBP13. También hay FKBP que carecen de residuos de aminoácidos conservados en el dominio FKBD y no pueden unir FK506 ni tienen actividad PPIasa como FKBP38 (Kang *et al.*, 2005; Lam *et al.*, 1995). El

dominio PPIasa de las FKBP's está involucrado en el plegamiento de proteínas catalizando la isomerización *cis/trans* de enlaces Xaa-Pro. Esto ocurre a través de la unión del péptido sustrato en el bolsillo hidrofóbico de la PPIasa (Galat, 2003). Las PPIasas reconocen un rango muy diverso de proteínas intra y extracelulares, mientras que sus interacciones moleculares con el sustrato por lo general son bastante débiles, por lo que se necesita una gran cantidad de enzima para la catálisis.

2.3.1 Clasificación de FKBP's

Hay dos criterios de clasificación de FKBP's, uno de ellos considera todas las FKBP's actualmente descritas o secuenciadas, incluyendo aquellas que pertenecen a otras especies, como bacterias, hongos u otros mamíferos. En total corresponden a 45 proteínas que se distribuyen en 6 grupos y se clasifican de acuerdo a su estructura terciaria, predicha por el programa TASSER (*Threading/ASSEMBLY/Refinement*) y comparadas con ciertas FKBP's bien caracterizadas (Somarelli *et al.*, 2008).

Otro criterio utilizado para clasificar las FKBP's consiste en dividir las de acuerdo a sus dominios de localización subcelular. Esta distribución considera 15 secuencias de FKBP's de mamíferos (**Figura 2**) y se agrupan en 4 grupos (Rulten *et al.*, 2006). El primero corresponde a las proteínas que tienen ubicación citoplasmática y sólo tienen dominios FKBD como lo son FKBP12 Y FKBP12.6 (Standaert *et al.*, 1990; Arakawa *et al.*, 1994); el segundo grupo de las FKBP's nucleares, posee dominios N-terminal con función desconocida y una o más secuencias de localización nuclear, como FKBP25 y FKBP135 (Jin *et al.*, 1992; Ishikawa *et al.*, 1998); las FKBP's con dominio TPR

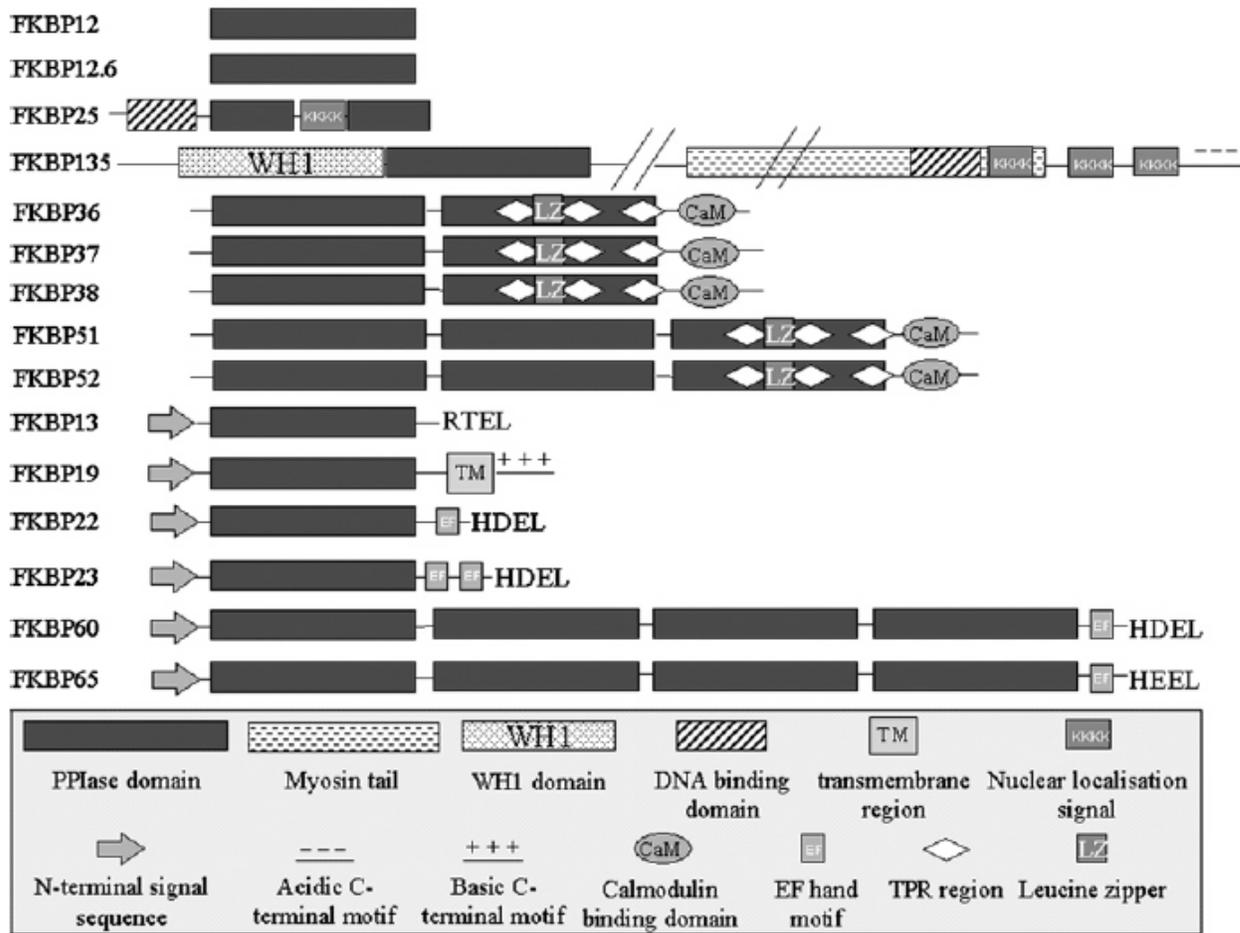


Figura 2: Esquema de dominios estructurales de 15 FKBP humanas. Los dominios estructurales que acompañan al dominio PPIasa permiten subdividir la familia FKBP en cuatro grupos, el primero sólo incluye el dominio PPIasa, el segundo tiene dominio de localización nuclear, el tercero posee regiones TPR y en el cuarto las secuencias tienen péptido señal en el N-terminal y motivos de retención en el retículo en el C-terminal (Rulten *et al.*, 2006).

(*Tetratricopeptide*) forman el tercer grupo y poseen dos o tres dominios FKBP y TPR en C-terminal, algunos ejemplos son FKBP36, FKBP38 y FKBP51 (Lam *et al.*, 1995; Meng *et al.*, 1998; Nair *et al.*, 1997); el grupo más grande pertenece a las FKBP de la vía secretoria, las cuales poseen péptido de señal, N-terminal rico en leucina y motivos de retención en el Retículo Endoplasmático (RE) en C-terminal, entre otras particularidades. Algunos miembros de este grupo son FKBP19, FKBP22 y FKBP65 (Rulten *et al.*, 2006; Davis, 2000; Patterson *et al.*, 2002).

2.3.2 FKBP12

La primera inmunofilina descrita fue FKBP12 en el año 1989 (Harding *et al.*, 1989, Siekierka *et al.*, 1989), desde entonces se ha estudiado por su acción de receptor de fármacos como por su interesante función celular. En el campo de la inmunosupresión, esta proteína es muy importante, ya que participa esencialmente en dos tipos de inmunosupresión, una mediada por Tacrolimus y la otra mediada por Rapamicina.

FKBP12 se encuentra abundantemente en el citoplasma de varios tipos celulares, asociándose constitutivamente con importantes receptores como el de Inositol 1,4,5-trifosfato (Cameron *et al.*, 1995), el receptor de Rianodina (Collins, 1991; Brillantes *et al.*, 1994; Wehrens *et al.*, 2003). Su interacción con éstos, le permite ser parte de la regulación del flujo de calcio intracelular, ya que al romperse la asociación se influencia la salida de calcio desde los canales (Steinmann *et al.*, 1991; Clipstone y Crabtree, 1992). Otra proteína que interacciona con FKBP12 es la GTPasa Ras. Frente

a la palmitoilación de Ras se asocia FKBP12 y promueve la depalmitoilación y el tráfico retrógrado, probablemente por su actividad PPIasa, ya que al modificar residuos prolina ubicados en Ras se bloquea la acción, pero no la unión de FKBP12 a Ras (Ahearn *et al.*, 2011).

Experimentos en ratones con deleciones del gen que codifica FKBP12 sugieren que esta proteína es esencial para la vida, ya que generalmente los ratones mueren a nivel embrionario manifestando una serie de anomalías principalmente cardíacas (Shou *et al.*, 1998). Este efecto podría ser explicado por una regulación del ciclo celular por parte de FKBP12.

Interesantemente, la inmunofilina 12 también se encuentra asociada al receptor tipo I de TGF- β (Wang *et al.*, 1996), uniéndose al dominio GS en la región citoplasmática del receptor y reprimiendo la señal. La sobre expresión de FKBP12 inhibe fuertemente la señal de TGF- β , mientras que la falta de FKBP12 (FKBP12^{-/-}) o su disociación, potencia la señal del ligando (Aghdasi *et al.*, 2001). En efecto, frente a la unión de TGF- β , el receptor de TGF- β tipo II fosforila el dominio GS al receptor tipo I y propaga la señal, sólo si FKBP12 no se encuentra unida al receptor tipo I (Huse *et al.*, 2001).

2.4 Factor de Crecimiento Transformante β (TGF- β)

El Factor de Crecimiento Transformante β (TGF- β) es una citoquina multifuncional (pleiotrópica), involucrada en diversos procesos en la mayoría de las células como proliferación, diferenciación celular, entre otros.

TGF- β es secretado como un complejo latente que incluye al péptido asociado a la latencia (*Latency Associated Peptide*, LAP) y un precursor inactivo de TGF- β (Avallat *et al.*, 1994). Este complejo denominado Complejo Latente Pequeño (*Small Latent Complex*, SLC) se puede asociar a la proteína de unión al TGF- β latente (*Latent TGF- β Binding Protein*, LTBP) a través puentes disulfuro con LAP, formándose el Complejo Latente Grande (*Large Latent Complex*, LLC) (Kanzaki *et al.*, 1990; Munger *et al.*, 1997). La liberación de TGF- β desde el complejo latente es esencial para el control de su bioactividad y es catalizado por proteinasas séricas como plasmina o trombospondina (Kondou *et al.*, 2003; De Caestecker, 2004). TGF- β activo se une al complejo del receptor de TGF- β , dónde el receptor tipo II fosforila y transactiva al receptor tipo I para promover las cascadas de señalización correspondientes (Wrana *et al.*, 1994).

A esta citoquina se le atribuye un papel inmunológico ya que suprime el crecimiento y diferenciación de muchos linajes de células inmunes, incluyendo células T y B (Sporn, 1999) mientras que en fibroblastos renales puede estimular la proliferación (Strutz *et al.*, 2001). Adicionalmente es responsable de acumulación patológica de matriz extracelular (Ziyadeh, 2004), estimula la producción de colágeno y fibronectina en cultivo de células mesangiales humanas (Iglesias-De La Cruz *et al.*, 2001) e induce

la expresión de integrinas y receptores que median interacciones celulares con proteínas de matriz extracelular (Peralta *et al.*, 2001). Interesantemente se ha demostrado un aumento de TGF- β tanto en el glomérulo como en el compartimento tubular de biopsias humanas y modelos experimentales de daño renal (Nakamura *et al.*, 1995; Sharma y Ziyadeh, 1994; Yamamoto *et al.*, 1996).

2.4.1 Receptor de Factor de Crecimiento Transformante β (T β R)

Los receptores de TGF- β son proteínas con un solo dominio transmembrana, tienen actividad serina/treonina quinasa y se conocen dos grupos, los receptores tipo I (T β RI) y tipo II (T β RII). Éstos forman complejos heteroméricos en presencia de los ligandos correspondientes y pueden interactuar con co-receptores endoglina y betaglicano, también llamados receptores tipo III (T β RIII) (Shi y Massagué, 2003; Gatza *et al.*, 2010; Bernabeu *et al.*, 2009). T β RIII, es un receptor auxiliar que estructuralmente es distinto a T β RI y T β RII. Carece del dominio quinasa, posee una región amplia en el extremo extracelular y una corta al interior de la célula. Su función es aumentar la unión del ligando a los receptores tipo I o tipo II, en algunos casos potencia la señal, mientras que en otros la inhibe (Gatza *et al.*, 2010; Bernabeu *et al.*, 2009; Santibanez *et al.*, 2007; Blanco *et al.*, 2005).

T β RI y T β RII son estructuralmente similares, poseen un dominio extracelular que forma tres dedos (*Three-finger Toxin*), un dominio transmembrana de cadena simple y un dominio serina/treonina quinasa en el extremo intracelular (Greenwald *et al.*, 1999). El receptor T β RI posee adicionalmente una región rica en glicinas y serinas, el dominio

GS (*Glycine/Serine rich domain*), el cual se encuentra estructuralmente arriba del dominio quinasa. En esta región se une inmunofilina 12 (Chen *et al.*, 1997).

La señalización a través de los receptores de TGF- β ocurre cuando el ligando se une al receptor, formándose un complejo estable entre el receptor tipo I y tipo II. La disociación de FKBP12 permite la fosforilación de T β RI por T β RII en el dominio GS, provocando un cambio conformacional que previene la unión de FKBP12 y promueve la unión del sustrato Smad (**Figura 3**) (Chen *et al.*, 1997; Huse *et al.*, 2001; Kang *et al.*, 2009). En células renales, el receptor tipo I fosforila a Smad2/3, este dímero se une a Smad4 y juntos translocan al núcleo donde interactúan con Factores de Transcripción (*Transcription Factors*, TFs,) y actúan como reguladores transcripcionales (Liu *et al.*, 1997). Por lo tanto, el efecto de TGF- β dependerá de TFs que se expresen específicamente en el tejido o célula donde está señalizando.

La Proteína Quinasa C (PKC) es parte de una ruta de señalización paralela a Smad, que también es activada por el receptor de TGF- β pero no produce los mismos efectos en Smad2/3, ni tampoco fosforila a éste en el mismo sitio que T β R, siendo efectos independientes (Yakymovych *et al.*, 2001). Para activar PKC se utiliza un análogo estructural de su activador natural Diacilglicerol (DAG), como es el Forbol miristato acetato (*Phorbol Myristate Acetate*, PMA) (Castagna *et al.*, 1982)

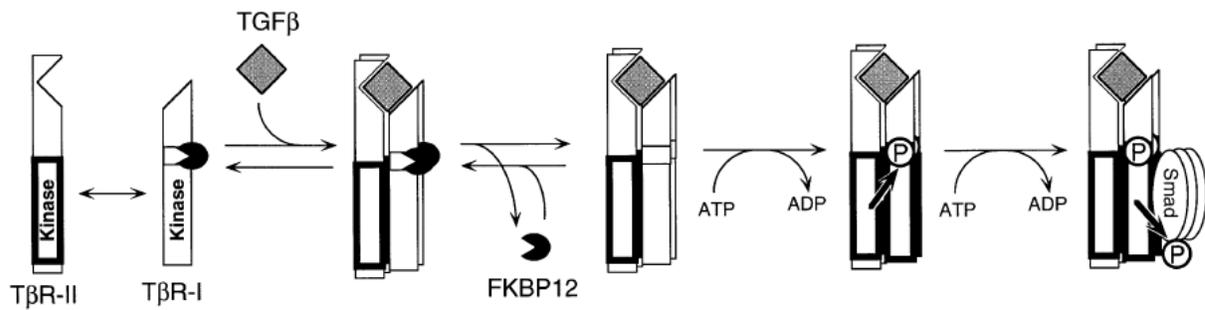


Figura 3. Modelo de inhibición del receptor de TGF-β por FKBP12. TβRII posee intrínsecamente actividad quinasa, la cual tiene la capacidad de fosforilar la región GS de TβRI, activándolo. En ausencia de ligando, FKBP12 se une a la región GS en TβRI e impide su activación por TβRII. Al interactuar con el ligando se forma un complejo ligando-receptor estable, se disocia FKBP12 lo que permite la fosforilación del dominio GS, la activación de TβRI y por lo tanto la activación de las moléculas de señalización Smad (Chen *et al.*, 1997).

2.5 Propuesta de trabajo

Los factores patogénicos de FK506 no han sido claramente establecidos, mientras que el mecanismo de acción clásico descrito para este inmunosupresor tampoco permite dilucidar la causa de los efectos adversos. Se cree que Tacrolimus estaría inhibiendo no solo la transcripción de genes a través de la inhibición de Calcineurina, sino también que estaría bloqueando la vía secretoria de proteínas a través de mecanismos que aún no se conocen completamente (Rauch *et al.*, 2009; Sandoval, 2014), lo que impediría la secreción de proteínas, por ejemplo Calicreína en el riñón.

Más aún, tanto Tacrolimus como Rapamicina se unen al mismo receptor intracelular (FKBP12), en el mismo bolsillo molecular, pero ejercen efectos distintos a nivel celular, a nivel de efectos secundarios y de los órganos afectados por éstos. Interesantemente, en el riñón se producen efectos contrapuestos, por una parte FK506 daña considerablemente este órgano y por otra SRL detiene la progresión de enfermedades renales (Chen *et al.*, 2012).

Por otro lado, el receptor intracelular FKBP12, tiene variadas funciones y se encuentra asociado a distintas proteínas y complejos, lo cual lo hace un factor importante de estudio para comprender el mecanismo de acción de Tacrolimus. Además, como se menciona anteriormente, FKBP12 se encuentra interactuando con el receptor de TGF- β tipo I, cuya vía se ve aumentada en algunas enfermedades renales, lo que sugiere que debería haber una relación entre los efectos adversos observados con el tratamiento con Tacrolimus y este receptor y su activación.

Por lo tanto resulta interesante estudiar el efecto de Tacrolimus en tejido renal sobre la vía de activación de TGF- β y la expresión de FKBP12. Un buen modelo para esto es la línea celular HK-2, que posee el fenotipo de células de túbulo proximal renal.

2.5.1 Hipótesis de trabajo

Tacrolimus secuestra a FKBP12 favoreciendo la activación de la vía de señalización de TGF- β y modulando la expresión de FKBP12.

2.5.2 Objetivos generales

Determinar la activación de la vía de señalización de TGF- β y la variación de la expresión de FKBP12 frente a tratamiento con Tacrolimus y Rapamicina en la línea celular HK-2.

2.5.3 Objetivos específicos

1. Analizar los niveles de p-Smad2/3 en la línea celular de túbulo proximal HK-2 tratadas con FK506 y Rapamicina.
2. Analizar la expresión de ARN mensajero de FKBP12 en ausencia y presencia de FK506 y Rapamicina en la línea celular de túbulo proximal HK-2.
3. Analizar los niveles de proteína de FKBP12 en la línea celular de túbulo proximal HK-2 en ausencia y presencia de FK506 y Rapamicina.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. Materiales

3.1.1. Material Biológico

3.1.1.1. Cultivo celular

Se utilizó la línea celular HK-2 (ATCC) de túbulo proximal de riñón humano, reconocida como un modelo fisiológico y empleada en varias investigaciones (Ryan *et al.*, 1994). Esta línea celular fue creada a partir de cultivo primario de células de túbulo proximal, las cuales fueron expuestas a un retrovirus recombinante con los genes del virus del papiloma humano (HPV 16) E6/E7. Esta inserción de genes inmortaliza células epiteliales de diverso origen sin provocar cambios significativos en su fenotipo o función (Ryan *et al.*, 1994).

3.1.2. Materiales Químicos.

De **Sigma-Aldrich** se obtuvo Brefeldina A 100 μ M

De **Tecoland Labs** se obtuvo Tacrolimus 10 mg/mL

De **Santa Cruz Biotechnology** se obtuvo phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) y Rapamicina (SRL).

De **Aldrich Chemicals (Milwaukee,WI, USA)** se obtuvo DMSO

De **Biological Industries (Beit Haemek Kibbnitz, Israel)** se obtuvo; medio Eagle modificado por Dulbecco enriquecido con F12 (DMEM F-12), y Antibiótico/Antifúngico (Penicilina 10000 u/mL, Estreptomina 10 mg/mL y Anfotericina 0,025 mg/mL).

De **Promega Corporation (Madison, WI, USA)** se obtuvo; Go Taq Green Master Mix, RQ1 RNase-Free DNase, Oligo (dT) 15 Primer, set de Deoxynucleotide Triphosphates (dNTPs), Tween 20, Tris base, glicina, Bisacrilamida, agarosa.

De **Invitrogen** se obtuvo RNase OUT™, SuperScript™ II Reverse Transcriptase, SYBR Safe DNA gel stain 400 U/U.

De **Maestrogen** se obtuvo; 100 bp DNA Ladder, Estándar proteínas 10-180 kDa.

De **Thermo Scientific** se obtuvo; Pierce® ECL Western Blotting Substrate, Pierce® BCA Protein Assay Reagent, agua libre de nucleasas grado biología molecular, Suero fetal bovino.

De **Merck y Co, Inc. (Darmstadt, Germany)** se obtuvo; TEMED, Metanol, Acrilamida, Etanol absoluto, isopropanol, acetona, cloruro de sodio, cloroformo.

De **Sigma Chemical CO (st. Louis, MO, USA)** se obtuvo; Triton X-100, 2-mercaptoetanol, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF).

De **Gibco Laboratories Life Technologies, Inc. (Rockville, MD, USA)** se obtuvo reactivo TRIZOL, persulfato de amonio (PSA), tripsina 2,5% 10X, L-glutamina 200 mM, Medio libre de queratinocitos (KSFM).

De **United Stated Biological (Swampscott, MA, USA)** se obtuvo; SDS, EDTA, Albumina de suero bovino.

De **Santa Cruz Biotechnology**, se obtuvieron los siguientes anticuerpos: IgG de ratón anti-FKBP12, IgG de ratón anti- β -actina, IgG de cabra anti-p-Smad2/3, IgG de ratón anti-Smad2/3 y los anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa, anti-IgG de ratón y anti-IgG de cabra.

De **Integrated DNA Technologies** se obtuvieron los siguientes partidores:

hFredFKBP12 (260 pb) F 5'-CAC CGG GAT GCT TGA AGA TGG AAA-3'

R 5'-GAG GCC ATT CCT GTC ATT CCA GTT -3'

β -act RS (295 pb) F 5'-TCA CCC ACA CTG TGC CCA TC-3'

R 5'-CAG CGG AAC CGC TCA TTG CC-3'

3.1.3. Equipos

Los equipos utilizados fueron los siguientes: Termociclador Mastercycler[®] personal Eppendorf, centrifuga 5810R Eppendorf, Refrigerador Consul, Freezer -20°C, Freezer -80°C ULT Freezer TCL, fuente de poder PowerPac[™] Basic Biorad, Sistema de

electroforesis Biorad, cámara de flujo laminar Labgard Class II Biological Safety Cabinet Nuaire, Incubador Nuaire CO₂ Air-Jacketed Incubator, Baño termorregulado Memmert Cientec, vortex Maxi Mix II Cientec, pHmetro Inolab pH720, pesa analítica RADWAG® AS 220/C/2, sonicador MISONIX XL-2000.

Para visualizar los geles de agarosa se usó el equipo INGENIUS de Syngene, para visualizar las membranas PVDF se usó el equipo ULTRA-LUM de ΩMEGA, para cuantificar ADN/ARN se usó NanoDrop 2000 de Thermo Scientific.

3.2. Métodos

3.2.1 Cultivo celular

Las células HK-2 fueron cultivadas a 37°C en una atmósfera húmeda conteniendo 5% de CO₂ en medio completo compuesto de DMEM-F12 suplementado con 10% de suero bovino fetal (SFB), glutamina 2 mM, penicilina 100 µg/mL, estreptomycin 100 U/mL y anfotericina 100 U/mL. También fueron cultivadas en las mismas condiciones anteriores pero con medio libre de queratinocitos suplementado con 5% de suero bovino fetal y factor de crecimiento epidermal (EGF).

Los pasajes se realizaron una vez a la semana mediante una tripsinización suave en T-flasks 25 cm² BD Falcon™.

3.2.2. Tratamiento de las células

Las células HK-2 se hicieron crecer hasta una confluencia de 80% en placas de 6 pocillos, luego se eliminó el medio de cultivo, se lavó tres veces con PBS 1X y se dejaron por 12 horas con medio DMEM F12 sin suero. A continuación se administró a cada pocillo un fármaco preparado en medio DMEM F12 sin suero. Los tratamientos administrados fueron DMSO 0,5%, PMA 10 μ M, BFA 5 μ M, FK506 100 nM y SRL 100 nM.

Transcurrido el tiempo necesario (30 minutos, 1 hora, 3 horas o 4 horas), se removió el medio con fármacos, se agregó PBS 1X (pH 7,4) y se procedió a extraer ARN y proteínas.

3.2.3. Extracción de proteínas totales

El cultivo se lavó con PBS 1X (pH 7,4) al término del tratamiento. Fue lisado directamente en la placa con 100 μ L de buffer de lisis (Sacarosa 0,6M. Tris/HCl 50 mM (pH 7,5), EDTA 15 mM, NaF 150 mM, Triton X-100 0,3%, inhibidores de proteasas 100 μ g/mL y PMSF 1 mM), Los lisados fueron sometidos a sonicación por unos segundos y luego fueron centrifugados a 13000 xg a 4°C por 20 minutos para separar el sobrenadante que contiene la fracción con proteínas. Estos se depositaron en un tubo microcentrífuga limpio y rotulado. Finalmente los extractos se cuantificaron a usando el kit BCA Protein Assay Reagent de Thermo Scientific.

3.2.4. Cuantificación de proteínas totales

Se utilizó el kit BCA Protein Assay Reagent de Thermo Scientific. La muestra se diluyó 16 veces (1:16) en una placa de 96 pocillos. Se incubó a 37°C por 30 minutos, luego se enfrió hasta temperatura ambiente. Para medir la absorbancia se utilizó un lector de placas Synergy 2 de Bio-Tek a 562 nm de longitud de onda. Finalmente se transfirieron los datos al programa Microsoft Excel y se realizaron los cálculos correspondientes.

3.2.5. Separación de proteínas por SDS-PAGE

La separación electroforética de las proteínas fue realizada en geles de poliacrilamida al 12%, los pocillos fueron cargados con 30 µg de proteínas totales. Las muestras fueron mezcladas con tampón de muestra para una concentración final de 1X (Tris 500 mM pH 6,8, SDS 10%, glicerol 20%, 2-β-mercaptoetanol 700 mM, tironina 0,8 mg/mL). Las muestras se separaron mediante la aplicación de un potencial de 80 mV, en buffer Tris-Glicina 1X (Tris pH 8,3 25 mM, glicina 190 mM y SDS 0,1%).

3.2.6. Transferencia de proteínas a membranas de PVDF

Una vez que las proteínas fueron separadas se procedió a transferirlas desde el gel hacia una membrana de PVDF de 0,2 µm de tamaño de poro. Primero se activó ésta con metanol por 10 segundos, se eliminó el exceso de metanol y se mantuvo 10 minutos en buffer de Tris-Glicina 1X metanol 20%. Se montó el equipo de electro transferencia entre el cátodo y el ánodo, embebido en buffer de transferencia (Tris pH

8,3 25 mM, glicina 190 nM, SDS 0,1% y metanol 20%), esponja, papel filtro, el gel, la membrana de PVDF, papel filtro y esponja. Este "Sandwich" se ubicó en la cámara de transferencia cubierta de buffer teniendo siempre la precaución que el gel con las proteínas quede del lado del cátodo y la membrana quede hacia el ánodo. La transferencia se realizó a 300 mA por 120 minutos en un ambiente frío (4°C).

3.2.7. Inmunodetección por Western blot

Para el análisis de Western Blot las membranas luego de retiradas del sistema de electrotransferencia, se bloquearon con 10 mL de solución de bloqueo (PBS 1X, Tween 20 0,3%, leche descremada 5%) durante 1 o 2 horas en agitación a temperatura ambiente, posteriormente las membranas fueron incubadas durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario a una dilución de 1:1000 para FKBP12 y β -actina y 1:500 para Smad2/3 y p-Smad2/3, a la mañana siguiente se les realizó 3 lavados de 10 minutos con PBS-Tween 20 0,05% en agitación a temperatura ambiente, para luego realizar la incubación con anticuerpo secundario (1:2000 para anti IgG de Conejo y Cabra; 1:3500 para anti IgG de Ratón) por 2 horas en agitación a temperatura ambiente. Finalmente las membranas se lavaron 3 veces con PBS-Tween 20 0,05%.

3.2.8. Revelado de las membranas

Para revelar las membranas se utilizó luminol (Pierce ECL Western Blotting Substrate) como sustrato para la reacción de quimioluminiscencia. Se mezcló partes

iguales de luminol y buffer peróxido y se adicionó directamente a la membrana. Mediante el equipo Ultra-LUM se detectó la señal exponiendo la membrana entre 1 a 30 minutos máximo.

3.2.9. Extracción de ARN

Para la obtención de ARN se utilizó el método de extracción de ARN total basado en el uso de fenol en mezcla con tiocianato de guanidino (Chomczynski y Sacchi, 1987) con algunas modificaciones.

Las células en monocapa crecidas en placas de 6 pocillos se homogenizaron directamente con 1 mL Reactivo TRIZOL (1 mL por 10 cm² de superficie con células), y se incubaron por 5 minutos a temperatura ambiente, luego se agregó 0,2 mL de cloroformo, la suspensión se agitó vigorosamente, se centrifugó a 12000 xg durante 15 minutos a 4°C. Posteriormente, la fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo y se precipitó el ARN con 0,5 mL de isopropanol frío, se dejó 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 12000 xg por 10 minutos a 4°C, el pellet se lavó con etanol 75% frío, se mezcló con vortex y se centrifugó a 7500 xg por 5 minutos a 4°C. Finalmente el pellet se dejó secar y se resuspendió en 50 µL de agua libre de nucleasas.

3.2.10. Reacción de la polimerasa en cadena acoplada a transcripción reversa (RT-PCR).

Para la transcripción reversa, se utilizó 2 µg de ARN total, 0,5 µg de Oligo dT, 1 µL de dNTP mix 10 mM y agua libre de nucleasas hasta un volumen de 12 µL. La mezcla se calentó a 65°C por 5 minutos y se enfrió inmediatamente en hielo. Luego se agregó 4 µL First-Strand Buffer 5X (Tris-HCl 250 mM, KCl 375 mM; MgCl₂ 15 mM, pH 8,3), 2 µL DTT 0,1 M, 1 µL de RNaseOut 40 U/µL, y se incubó a 42°C por 2 minutos. Finalmente se adicionó 1 µL (200 U) de la enzima SuperScript™ II RT, se mezcló bien, y se incubó a 42°C por 50 minutos. La reacción se inactivó a 70°C por 15 minutos.

La amplificación (PCR) fue desarrollada en un termociclador Mastercycler® personal Eppendorf de la siguiente manera: 5 minutos a 94°C, 30 ciclos de 30 segundos para la desnaturación a 94°C, 30 segundos a 55°C para la temperatura de alineamiento y 30 segundos a 72°C para la extensión. 10 minutos a 72°C para la extensión del producto final. Cada reacción contiene: dATP 200 µM, dGTP 200 µM, dCTP 200 µM, dTTP 200 µM, MgCl₂ 2,5 mM, y 0,5 µM de cada partidor. Se agregó al mix 1 µL de ADN complementario, y agua libre de nucleasas para un volumen final de 15 µL. Los productos de amplificación obtenidos se resolvieron en un gel de agarosa al 1,5% y se visualizaron por tinción con Sybr safe. Como control de carga se realizó la amplificación usando los partidores para beta-actina.

3.2.11. Análisis densitométrico

El análisis densitométrico para Western blot y RT-PCR se realizó mediante el programa ImageJ. La imagen digital obtenida de ambos métodos se procesó para invertir colores y eliminación del background. Las bandas se delimitaron simultáneamente para ser comparadas bajo la misma área. La intensidad de las bandas se expresó como curvas basadas en la intensidad de pixel de éstas. Los valores se obtuvieron como una medida del área bajo la curva de cada una de las bandas. Finalmente se estableció la razón de cada valor con los obtenidos para el control de carga correspondiente para normalizar los datos.

3.2.12. Análisis estadístico

Los datos de todas las gráficas fueron presentados como promedio \pm desviación estándar. La significancia estadística fue evaluada usando la prueba t student utilizando el programa STATGRAPHICS Plus.

4. RESULTADOS

4.1 Efecto de FK506 y SRL en la activación del Receptor de TGF- β .

En el primer objetivo de esta tesis se planteó el análisis del efecto de los fármacos inmunosupresores Tacrolimus (FK506) y Rapamicina (SRL) en la activación del receptor de TGF- β , debido a que ambos requieren de su unión a FKBP12 para ejercer su efecto. Si bien Tacrolimus se une a FKBP12 para ejercer su acción inmunosupresora, no se ha descrito una vía que permita explicar sus efectos adversos en el riñón. Antecedentes de nuestro laboratorio sugieren que uno de los mecanismos que podría causar los efectos secundarios del tratamiento con Tacrolimus, es la inhibición de la secreción de proteínas (Rauch *et al.*, 2009; Cutiño, 2011; Sandoval, 2014). Para comparar este efecto se utiliza un inhibidor de la secreción de mecanismo conocido, como Brefeldina A (BFA). Se ha demostrado que BFA produce un desensamblaje y redistribución del complejo de Golgi y sus componentes proteicos, bloqueando marcadamente la vía secretoria (Klausner *et al.*, 1992; Pelham, 1991). En cambio, Rapamicina, si bien se une en el mismo sitio que Tacrolimus a la proteína FKBP12, no tiene el mismo mecanismo de acción, sino que logra la inmunosupresión por otra vía. Además, se conoce como un fármaco benéfico para el riñón.

TGF- β es una citoquina muy importante en el organismo ya que controla diversos procesos a nivel celular y de tejido. Su actividad la realiza al unirse y activar su receptor

ubicado en la membrana celular, el cual desencadena una serie de señales a través de fosforilaciones, translocaciones, entre otras (Heldin *et al.*, 1997). Uno de los pasos más relevantes es la fosforilación de las moléculas de señalización Smad2 y Smad3, los que activados como complejo Smad2/3 interaccionan con Smad4 para luego translocar al núcleo donde se unen a factores de transcripción y ejercen su función modulando la transcripción (Dennler *et al.*, 1998). La forma activada de Smad2/3 (p-Smad2/3) se puede apreciar a través de experimentos de Western blot comparando la cantidad de p-Smad2/3 versus Smad2/3 total (Heldin *et al.*, 1997).

Dentro de las complejas redes de señalizaciones de la célula, se ha demostrado que PKC regula la señalización de T β R, fosforilando a Smad2 y Smad3 en una región distinta a la fosforilada por T β RI (Yakymovych *et al.*, 2001). Por esta razón, se utilizó el análogo de DAG, PMA, para activar PKC y así estudiar sus efectos en el modelo de estudio (Castagna *et al.*, 1982), en este caso, específicamente se utilizó para demostrar un posible efecto en la fosforilación de Smad2 y Smad3.

Los resultados de este experimento indican que PMA (10 μ M) y BFA (5 μ M) luego de 4 horas de tratamiento, producen una disminución de alrededor de 15% en la fosforilación de Smad2/3 (**Figura 4**). Mientras que no se observan diferencias significativas para el tratamiento de 4 horas con Tacrolimus (100 nM) comparado con el control DMSO. A su vez, tampoco se observan diferencias en la condición de Rapamicina (100 nM) respecto al control. Sin embargo, sí podemos observar que hay una disminución (alrededor de 20%) de los niveles de activación de T β RI con el tratamiento de 4 horas con Rapamicina con respecto a Tacrolimus.

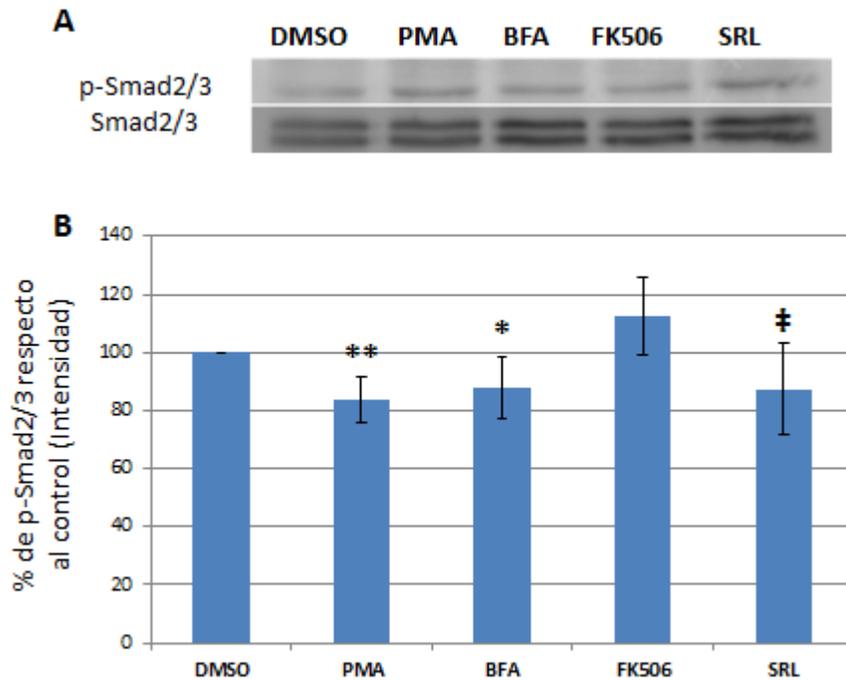


Figura 4. Efecto de FK506 y SRL en la activación de T β R a 4 horas de tratamiento.

Los cultivos celulares de HK-2 fueron tratados con distintos compuestos, incluyendo los fármacos inmunosupresores en sus concentraciones terapéuticas durante 4 horas. **A.** Inmunodetección de p-Smad2/3 con un anticuerpo específico, cada casilla indica el tratamiento aplicado. Las bandas inferiores corresponden al Western blot de Smad2/3 para las mismas muestras. **B.** Cuantificación densitométrica del análisis de Western blot normalizado con el control Smad2/3 en cada condición. DMSO: células control con Dimetilsulfóxido 0,5%, PMA: Phorbol 12-myristate 13-acetate 10 μ M, BFA: Brefeldina A 5 μ M, FK506: Tacrolimus 100 nM, SRL: Sirolimus o Rapamicina 100 nM. * $p < 0,05$ respecto a DMSO, ** $p < 0,01$ respecto a DMSO, ‡ $p < 0,05$ respecto a FK506.

En el resultado anterior registramos diferencias significativas al comparar la activación de T β R entre FK506 y SRL, sin embargo ninguno presentó diferencias significativas respecto al control (**Figura 4**). Por esta razón, se realizó otro estudio para observar el efecto de estos dos inmunosupresores respecto al control a menor tiempo, ya que es posible que la respuesta en la activación del receptor sea más rápida, ocurriendo antes de las 4 horas. Para esto, se trataron células HK-2 con ambos inmunosupresores por tres períodos de tiempo distintos (30, 60 o 180 minutos). Se extrajeron proteínas totales de cada condición y se analizaron por Western blot con un anticuerpo específico para p-Smad2/3 (**Figura 5**).

A la media hora de tratamiento se observa que aumenta considerablemente la activación de Smad2/3 por Tacrolimus, llegando a 60% sobre el control, mientras que SRL no produce cambios (**Figura 5A, 5D**). Al tratar las células por una hora se observa en Tacrolimus un claro aumento de 20% en la fosforilación de Smad2/3. Por otro lado, SRL no presenta aumento en p-Smad, probablemente porque el efecto es más tardío (**Figura 5B, 5E**). A las 3 horas de tratamiento con Tacrolimus se observa una disminución de 15% en la activación de p-Smad2/3. En el caso de SRL se observa un aumento considerable de casi 40% en la activación de T β R (**Figura 5C, 5F**).

Esto significa que a los 30 min ya ha comenzado el efecto de FK506, por lo que podría ser un efecto temprano, rápido e intenso, mientras que SRL tendría un efecto un poco más tardío y de menor intensidad.

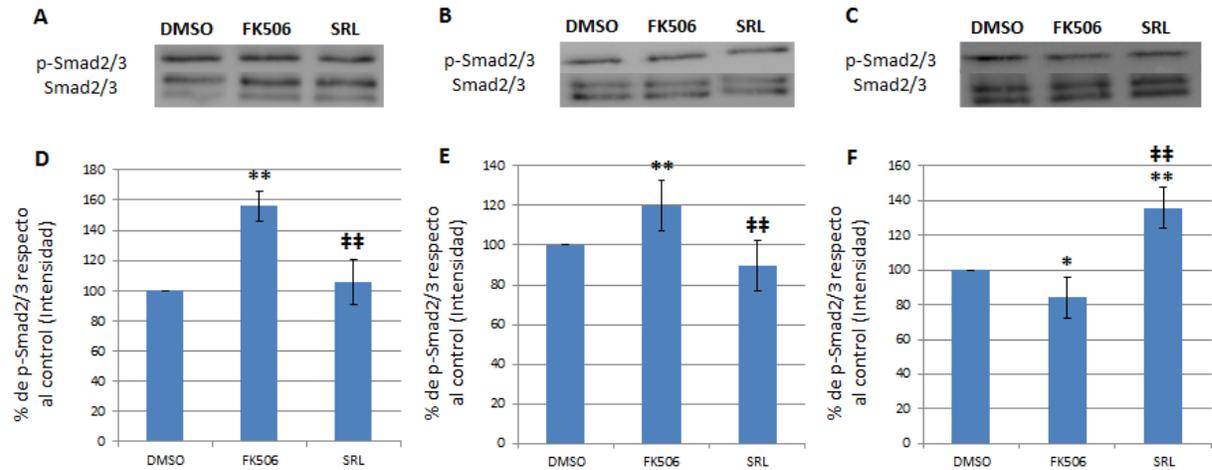


Figura 5. Efecto de FK506 y SRL en la activación de T β R a distintos tiempos. Los cultivos celulares de HK-2 fueron tratados con dos inmunosupresores en sus concentraciones terapéuticas durante 30, 60 y 180 minutos, luego se extrajeron proteínas totales. **A, B, C.** Inmunodetección utilizando un anticuerpo específico para p-Smad2/3, cada casilla indica el fármaco con que las células fueron tratadas por 30 minutos (A), 60 minutos (B) o 180 minutos (C). Las bandas inferiores corresponden al Western blot de Smad2/3 para las mismas muestras. **D, E, F.** Cuantificación densitométrica de la inmunodetección normalizado con Smad2/3 en cada condición (F, 30 minutos; E, 60 minutos; F, 180 minutos). DMSO: células control con Dimetilsulfóxido 0,5%, FK506: Tacrolimus 100 nM, SRL: Rapamicina 100 nM. * $p < 0,05$ respecto a DMSO, ** $p < 0,01$ respecto al control DMSO, ‡‡ $p < 0,01$ respecto a FK506.

La señalización intracelular de TGF- β provoca un aumento de p-Smad2/3 que va decayendo en el tiempo, ya que el receptor es regulado negativamente por su propia señalización (Yan *et al.*, 2009; Huang y Chen 2012). Por lo tanto esperamos que la activación de Smad2/3 sea gradual en el tiempo y decaiga, comportándose de manera similar que la activación natural por el estímulo de TGF- β .

Resumiendo, en la **Figura 5** podemos ver que se fosforila Smad2/3 con Tacrolimus, con un máximo de fosforilación de Smad2/3 de casi 60% más que el inicial, mientras que la activación con Rapamicina llega a un aumento de p-Smad2/3 de 40%. Además notamos que disminuye la activación de T β R por FK506 a medida que aumenta el tiempo de exposición al fármaco, lo cual era esperado por la regulación propia del receptor.

4.2 Efecto de FK506 y SRL en la expresión de FKBP12.

El segundo objetivo de esta investigación plantea analizar el efecto de FK506 y SRL en la expresión génica de FKBP12, ya que esta inmunofilina se encuentra unida al receptor TGF- β tipo I bloqueando su activación (Chen *et al.*, 1997). FKBP12 es una proteína muy abundante y se encuentra en casi todos los tejidos. Ejerce actividad como isomerasa de péptidos de prolina (PPIasa) y se une a varios receptores como el Receptor de Rianodina I (Collins 1991; Brillantes *et al.*, 1994) y al Receptor de IP3 (Cameron *et al.*, 1995). Nuestro interés principal radica en su función como receptor de los inmunosupresores Tacrolimus y Rapamicina.

Intentando dilucidar un mecanismo que explique los efectos secundarios de FK506, nuestro grupo ha registrado alterada la expresión de FKBP12 frente al tratamiento con Tacrolimus en páncreas, linfocitos (Sandoval, 2014) y células de Sertoli (Cutíño, 2011). En estos estudios también se ha observado que PMA aumenta considerablemente los niveles proteicos de FKBP12 en células de Sertoli y linfocitos (Cutíño, 2011; Sandoval, 2014). Por esta razón, como primera aproximación para analizar la expresión génica, se determinó la presencia de RNA mensajero de FKBP12 en las muestras sometidas a los distintos tratamientos.

En la **Figura 6A** se observan los productos de RT-PCR separados en un gel de agarosa 1,5%, donde las células HK-2 fueron tratadas con PMA (10 μ M), BFA (5 μ M), FK506 (100 nM) y SRL (100 nM) por 4 horas. Los resultados del análisis densitométrico (**Figura 6B**) muestran disminución de los niveles de ARN mensajero de FKBP12 con el tratamiento de PMA (30%), FK506 (30%) y SRL (25%).

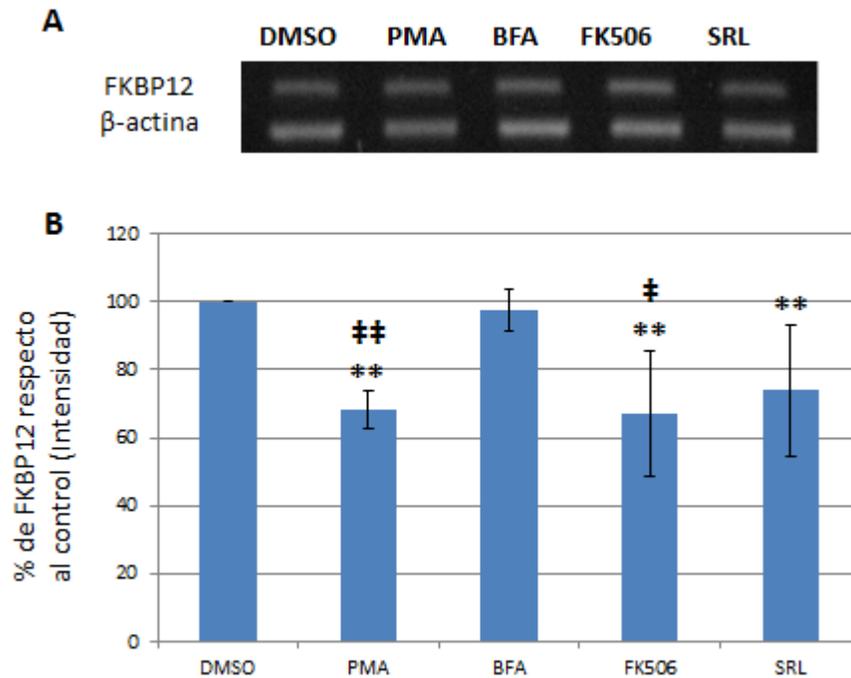


Figura 6. Efecto de FK506 y SRL en la expresión de FKBP12. Células HK-2 fueron tratadas con distintos compuestos incluyendo FK506 y SRL en sus concentraciones terapéuticas por 4 horas, luego se realizó extracción de ARN mensajero y RT-PCR. **A.** Análisis de productos de RT-PCR amplificando específicamente FKBP12 y β -actina, resueltos en un gel de agarosa 1,5%, se indica en cada casilla los compuestos utilizados. **B.** Cuantificación densitométrica del PCR normalizado con β -actina. DMSO: células control con Dimetilsulfóxido, PMA: Phorbol 12-myristate 13-acetate, BFA: Brefeldina A, FK506: Tacrolimus, SRL: Sirolimus o Rapamicina. ** $p < 0,01$ respecto al control DMSO; $\pm p < 0,05$ respecto a BFA; $\pm\pm p < 0,01$ respecto BFA.

Si bien FKBP12 es el receptor intracelular de ambos inmunosupresores, con Rapamicina se ha observado beneficios en fibrosis a nivel renal (Chen *et al.*, 2012) a diferencia de los efectos adversos con Tacrolimus. Además, la señalización del receptor T β R se ve afectada por los dos fármacos, como se observa en las **Figuras 4 y 5** pero con distinta intensidad, por lo que era posible esperar alguna diferencia en la expresión génica de FKBP12, pero los resultados muestran que la disminución de los niveles de ARN mensajero es similar para ambos.

Como se ha mencionado previamente, la utilización de BFA, permite analizar los efectos de la inhibición de la secreción proteica. Resultados de nuestro laboratorio han demostrado que la inmunofilina 12 no es afectada a nivel de ARN mensajero por la acción de BFA en varios tipos celulares, pero se ve una disminución de su secreción (Rauch *et al.*, 2009; Cutiño, 2011; Sandoval, 2014). En este caso, tal como se esperaba, el tratamiento con BFA no produjo diferencias en los niveles de ARN mensajero.

Debido a que como resultado con el tratamiento con Tacrolimus y Rapamicina se obtuvo proporcionalmente, la misma disminución de ARN mensajero para ambos fármacos a las 4 horas de tratamiento y considerando que ambos activan T β R a tiempos menores de 4 horas, decidimos analizar la variación que producen FK506 y SRL en la expresión de esta inmunofilina a 30 minutos, 1 hora y 3 horas. Realizamos extracción de ARN mensajero de las células tratadas con Tacrolimus o Rapamicina a distintos tiempos (30, 60 o 180 minutos) y estudiamos a través de RT-PCR la expresión de FKBP12.

A diferencia de lo que ocurre a tiempos mayores, a 30 o 60 minutos de tratamiento no se observan diferencias estadísticamente significativas en la cantidad de ARN mensajero detectado con ninguno de los inmunosupresores (**Figura 7**). No obstante, a las 3 horas de tratamiento, se observa una disminución de la cantidad de ARN mensajero de FKBP12 tanto con Tacrolimus como con Rapamicina en una proporción similar para ambos tratamientos de 40% y 30% (**Figura 7C, 7F**). En resumen, estos fármacos producen una disminución de la cantidad de ARN mensajero detectado a las 3 y 4 horas de tratamiento, pero siempre la disminución es levemente menor con SRL. Esto sugiere que ambos fármacos actúan por una vía similar que modula la expresión génica de FKBP12 y que el mecanismo clásico de inhibición de Calcineurina descrito para FK506 no sería relevante en la activación de T β R ni en la disminución del ARN mensajero de FKBP12.

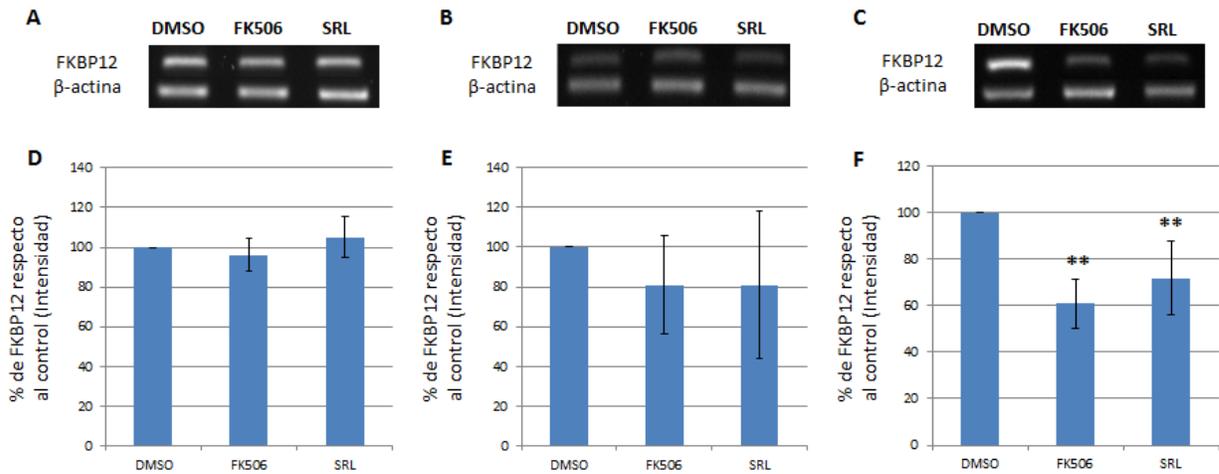


Figura 7. Efecto de FK506 y SRL en la expresión génica de FKBP12 a distintos tiempos. Los cultivos celulares de HK-2 fueron tratados con dos fármacos inmunosupresores en sus concentraciones terapéuticas durante 30 (**A, D**), 60 (**B, E**) o 180 (**C, F**) minutos. **A, B, C.** Análisis de productos de RT-PCR para FKBP12 con partidores específicos, en un gel de agarosa 1,5%, cada casilla indica el tratamiento aplicado. Las bandas inferiores corresponden al RT-PCR de β -actina para las mismas muestras. **D, E, F.** Cuantificación densitométrica del análisis de RT-PCR normalizado con β -actina en cada condición. DMSO: células control con Dimetilsulfóxido, FK506: Tacrolimus, SRL: Sirolimus o Rapamicina. ** $p < 0,01$ respecto a DMSO.

4.3 Efecto de FK506 y SRL en los niveles proteicos de FKBP12.

Como se ha mencionado antes, FKBP12 funciona como receptor de los fármacos inmunosupresores Tacrolimus y Rapamicina. Esta proteína tiene un tamaño bastante pequeño, de 12 kDa y está presente en la mayoría de los tejidos (Collins, 1991; Brillantes *et al.*, 1994; Wehrens *et al.*, 2003).

De acuerdo a los resultados de expresión génica, observamos que Tacrolimus y Rapamicina disminuyen los niveles de ARN mensajero de la inmunofilina 12 a las 3 y 4 horas de tratamiento. Sin embargo, esto no necesariamente se correlaciona en forma directa con el efecto de ambos sobre los niveles de proteína, tal como fue demostrado por los antecedentes previos de nuestro laboratorio, en análisis similares realizados con FK506 en células pancreáticas y células de Sertoli (Sandoval, 2014; Cutiño, 2011). En estos estudios, el tratamiento con FK506 disminuyó el ARN mensajero de FKBP12 y produjo aumento en la cantidad de la proteína detectada debido a su acumulación intracelular. Por lo que es relevante demostrar en el modelo en estudio en esta tesis, el efecto que produce el tratamiento con FK506 y SRL a nivel proteico, tal como se propuso en el tercer objetivo de este trabajo.

Para esto, se realizó la inmunodetección por Western blot de FKBP12 desde las proteínas totales extraídas de células HK-2 tratadas con PMA (10 μ M), BFA (5 μ M), FK506 (100 nM) y SRL (100 nM) por 4 horas (**Figura 8**) Los resultados no muestran diferencias significativas para ninguna de las condiciones analizadas con respecto al control o a cualquier otro fármaco estudiado. Interesantemente no se observa una disminución proteica que se correlacione con la disminución de ARN mensajero

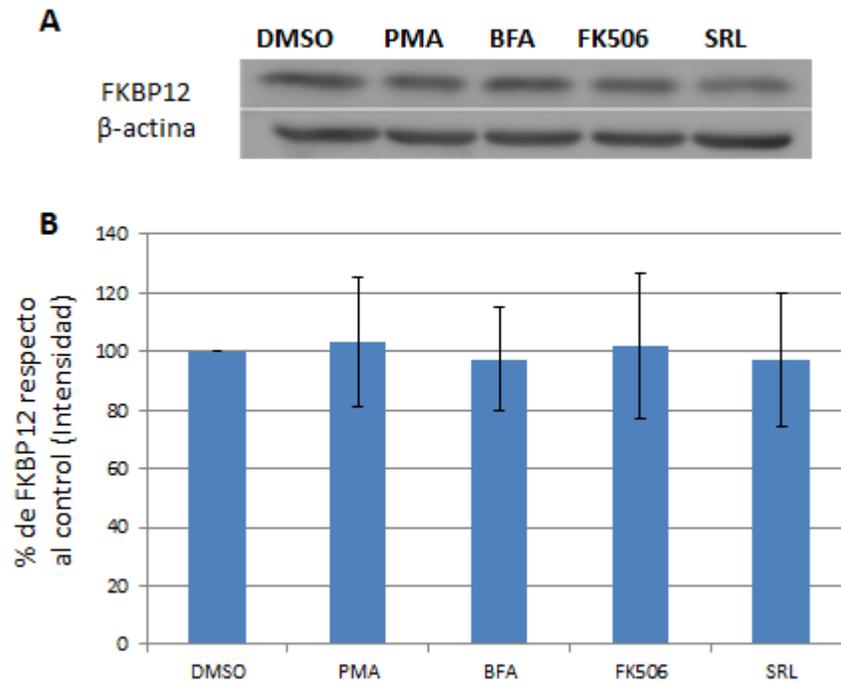


Figura 8. Efecto de FK506 y SRL en la proteína FKBP12. Los cultivos celulares de HK-2 fueron tratados con distintos compuestos incluyendo FK506 y SRL en sus concentraciones terapéuticas durante 4 horas. **A.** Inmunodetección de FKBP12 con un anticuerpo específico, cada casilla indica el compuesto con que las células fueron tratadas. Las bandas inferiores corresponden al Western blot de β -actina para las mismas muestras. **B.** Cuantificación densitométrica del análisis de Western blot normalizado con β -actina en cada condición. No se observan diferencias significativas al comparar cada fármaco con el control. DMSO: células control con Dimetilsulfóxido, PMA: Phorbol 12-myristate 13-acetate, BFA: Brefeldina A, FK506: Tacrolimus, SRL: Sirolimus o Rapamicina.

presentada en las **Figura 6** ni se observa un aumento en la detección de esta inmunofilina que pueda atribuirse a su acumulación intracelular.

Los resultados de expresión génica de FKBP12 nos indican que ocurre una disminución del ARN mensajero de esta inmunofilina a las 3 y 4 horas de tratamiento tanto con Tacrolimus como con Rapamicina (**Figuras 6 y 7**). Sin embargo, a las 4 horas no se observó un efecto significativo en los niveles proteicos de FKBP12 (**Figura 8**), por lo que es necesario dilucidar si Tacrolimus o Rapamicina producen un efecto en la cantidad de proteína a tiempos menores, y si esto se correlaciona con los resultados obtenidos anteriormente.

De acuerdo a la **Figura 9**, se produce un cambio al tratar las células por 30 minutos con FK506 (100 nM) o SRL (100 nM), donde se observa un aumento de 20% en la cantidad de proteína FKBP12 detectada con ambos fármacos (**Figura 9A, 9D**). De igual forma, a 1 hora de tratamiento observamos un aumento significativo de FKBP12 en ambas condiciones de alrededor de 15% (**Figura 9B, 9E**). Por último, a las 3 horas de tratamiento se produce un aumento de 15% en la cantidad proteica de FKBP12 con Rapamicina, pero no ocurre así con FK506 (**Figura 9C, 9F**).

Resumiendo, respecto a Tacrolimus se registra que la cantidad de FKBP12 detectada aumenta y luego desciende a los valores control, mientras que en el caso de Rapamicina se ve un incremento y disminución gradual a medida que aumenta el tiempo (**Figura 9**). La disminución de FKBP12 a las 3 y 4 horas provocada por FK506

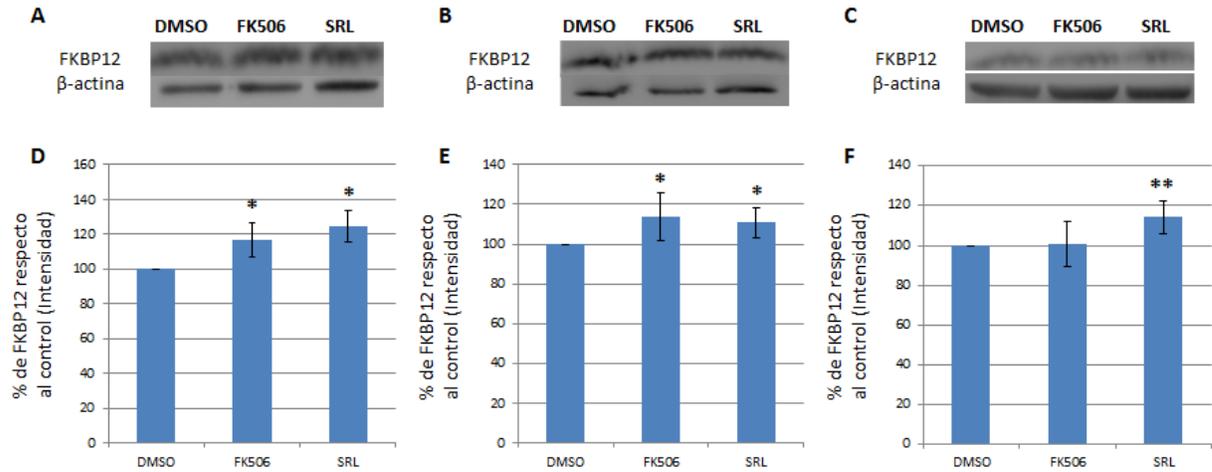


Figura 9. Efecto de FK506 y SRL en los niveles de proteína FKBP12. Los cultivos celulares de HK-2 fueron tratados con dos inmunosupresores en sus concentraciones terapéuticas durante 30 (A, D), 60 (B, E) o 180 (C, F) minutos. A, B, C. Inmunodetección por Western blot para FKBP12 con un anticuerpo específico, cada casilla indica el fármaco con que las células fueron tratadas. Las bandas inferiores corresponden al Western blot de β -actina para las mismas muestras. D, E F. Cuantificación densitométrica del análisis de Western blot normalizado con β -actina en cada condición. DMSO: células control con Dimetilsulfóxido, FK506: Tacrolimus, SRL: Sirolimus o Rapamicina. * p < 0,05 respecto a DMSO; ** p < 0,01 respecto al control DMSO.

se correlaciona con la disminución en los niveles de ARN mensajero en los mismos tiempos. Lo que no ocurre con Rapamicina, ya que se produce un aumento leve (alrededor de 15%) en los niveles proteicos a las 3 horas de tratamiento.

5. Discusión

En nuestro laboratorio se ha estudiado ampliamente el mecanismo de Tacrolimus, intentando dilucidar una vía distinta a la canónica que sea capaz de explicar los efectos adversos de este inmunosupresor. Actualmente nuestros estudios han brindado importantes evidencias de un efecto adicional de este fármaco gracias a una novedosa estrategia utilizada. A menudo los estudios con FK506 abarcan períodos de 8 a 48 horas para estudiar sus efectos en secreción de proteínas como insulina (Redmon *et al.*, 1996; Oetjen *et al.*, 2003; Øzbay *et al.*, 2011), IL-2 (Kahan 1987) o TGF- β (Wu *et al.*, 2012; Lan *et al.*, 2014), en nuestro caso utilizamos tiempos cortos de incubación con Tacrolimus, de 4 horas o menos. Esta estrategia nos permitió descubrir que Tacrolimus tiene un efecto que involucra el bloqueo parcial de la vía secretoria por un mecanismo aún desconocido (Rauch *et al.*, 2009; Cutiño, 2011; Sandoval, 2014).

En la presente investigación, observamos que tanto Tacrolimus como Rapamicina aumentan la fosforilación de Smad2/3 y por tanto activan el receptor de TGF- β (T β R). Adicionalmente, ambos inmunosupresores disminuyen la expresión génica de FKBP12 y aumentan sus niveles proteicos con diferencias en el tiempo e intensidad.

PMA (c) es un ester de forbol análogo de diacilglicerol (DAG), que produce la estimulación de la Proteína Quinasa C (PKC). En este estudio encontramos que PMA, disminuye la activación del Receptor de TGF- β , expresado por la disminución del 15% en la fosforilación de Smad2/3 a las 4 horas de tratamiento. Está descrito que a tiempos

largos (24 horas) PKC aumenta la bioactividad de TGF- β en células mesangiales (Studer *et al.*, 1995), en células mesoteliales (Ha *et al.*, 2001) y en células de Sertoli (Cutíño, 2011). Mientras que a tiempos menores (1 hora) se produce un entrecruzamiento de señales entre PKC y TGF- β , donde PKC fosforila a las moléculas de señalización Smad2 y Smad3 (Yakymovych *et al.*, 2001). Esta fosforilación de Smad2 y Smad3, no es la misma que realiza el Receptor de TGF- β , ya que no activa ni promueve la translocación de Smad2/3. Lo que sí provoca, es el bloqueo de la función de Smad3, debido a que el sitio de fosforilación por PKC se encuentra cercano al que utiliza Smad3 para unirse al ADN (Shi *et al.*, 1998; Yakymovych *et al.*, 2001).

En el tratamiento con Brefeldina A (BFA), vemos una disminución de la activación de T β R, efecto que concuerda con los resultados de otras investigaciones. Esta disminución se podría explicar porque se disminuye tanto la expresión como la secreción de TGF- β . Si bien esto ocurre en células de Sertoli (Cutíño, 2011), nuestros resultados podrían sugerir que se repite en HK-2. Para demostrar este fenómeno se debería evaluar la expresión y secreción de TGF- β frente al tratamiento con BFA en células HK-2, y a su vez evaluar la fosforilación de Smad en células de Sertoli. Sería interesante que ambos tipos celulares se comporten de igual forma, porque esto sugeriría un mecanismo similar para distintos tipos celulares. Adicionalmente, un estudio reciente vincula a BFA como inhibidor de algunas funciones de TGF- β a través del bloqueo de la secreción en células de adenocarcinoma colorectal (Nazir *et al.*, 2015).

En el mismo estudio con células de Sertoli, observaron que Tacrolimus tiene un efecto similar a BFA, inhibiendo tanto la expresión de TGF- β , como su secreción. Con estos antecedentes esperábamos observar la misma disminución al utilizar FK506, sin embargo nuestros resultados no mostraron diferencias significativas en la fosforilación de Smad2/3 frente al tratamiento con Tacrolimus a las 4 horas. En este caso, creemos que el efecto de Tacrolimus podría ser más temprano y de menor duración, por lo que a las 4 horas ya se habría perdido. Al evaluar la fosforilación de Smad2/3 a tiempos menores del tratamiento observamos que efectivamente Tacrolimus es capaz de activar la señalización de TGF- β durante un período corto. Apoyando estos resultados, se ha demostrado que Tacrolimus activa el receptor de TGF- β y promueve la proliferación en células vasculares de músculo liso (VSMC) (Giordano *et al.*, 2008), también en fibroblastos renales (TK-173) produce efectos proliferativos e induce genes relacionados con fibrosis, como Nox4, tropomiosina I y transgelina (Kern *et al.*, 2014). Efecto que ocurre incluso cuando se encuentra inhibido el ligando (Kern *et al.*, 2014). Con estos antecedentes podemos especular que FK506 al unirse a FKBP12, libera la interacción de la inmunofilina y el T β RI lo cual es suficiente para activar la señalización (Giordano *et al.*, 2008).

Como se menciona anteriormente, Tacrolimus se une a FKBP12 para ejercer su efecto a nivel celular. Notablemente, Rapamicina (SRL, Sirolimus) es un macrólido estructuralmente similar a FK506, que al entrar a la célula también se une a FKBP12 pero no ejerce acción en Calcineurina y tampoco se han visto efectos nefrotóxicos como los de Tacrolimus. El complejo SRL-FKBP12 es capaz de bloquear la acción de la quinasa mTOR (*mammalian Target of Rapamycin*) en el complejo 1 (mTORC1)

(Abraham, 1998). Cuando IL-2 se une a su receptor, se promueve una serie de señales intracelulares dentro de las que se encuentra la activación de mTORC1 para avanzar de G1 a S en el ciclo celular (Liao *et al.*, 2011).

Nosotros observamos que Rapamicina fue capaz de estimular la fosforilación de Smad2/3 pero este efecto fue más tardío que el de Tacrolimus (a las 3 horas Rapamicina, mientras que FK506 lo hizo de los 30 minutos a 1 hora) y de menor intensidad. Esta desigualdad puede influir en la diferencia de efectos adversos de ambos fármacos. De acuerdo con esto, se ha descrito que Rapamicina también sería capaz de activar el receptor de TGF- β en células VSMC y fibroblastos, pero no promueve la proliferación (Giordano *et al.*, 2008; Kern *et al.*, 2014). Se cree que SRL bloquea la respuesta a la fosforilación de Smad2/3 a través de otros factores como la inhibición de mTOR, pero el mecanismo no ha sido demostrado (Chen *et al.*, 2012). Incluso hay reportes de Rapamicina produciendo fibrosis al activar la vía de TGF- β /Smad en células mesangiales (Osman *et al.*, 2009), pero con un daño renal bastante menor al comparar con FK506 (Sehgal, 1998; Shihab *et al.*, 2004), por lo que podría no ser capaz de causar nefrotoxicidad.

Interesantemente, Ciclosporina A (CsA) inhibe Calcineurina de la misma manera que Tacrolimus, pero no logra activar la vía de T β R (Kern *et al.*, 2014). El mecanismo de CsA involucra un receptor intracelular distinto, aunque de la misma familia que FKBP12, llamado ciclofilina (Liu *et al.*, 1991), por lo que el efecto que observamos de FK506 debe ser mediado por FKBP's más que por inhibición de CaN, lo que concuerda al observar un efecto similar, pero no igual con Rapamicina.

Probablemente el mecanismo por el cual FK506 es capaz de aumentar la señalización del receptor de TGF- β no sea solo a través de la inmunofilina 12, ya que SRL se une con mayor afinidad a FKBP12 ($K_d=0,2$ nM) que Tacrolimus ($K_d=0,4$ nM) (Bierer *et al.*, 1990), por lo que se esperaría que SRL tenga una mayor influencia. Por otro lado, Rapamicina inhibe mTOR, lo que a su vez inhibe la proliferación, considerando esto es posible que al inhibir mTOR se disminuya de alguna manera el efecto de T β R (Chen *et al.*, 2012). Estas diferencias podrían explicar sus distintos efectos a nivel renal, en donde Tacrolimus produce toxicidad y Rapamicina protección.

FKBP12 es la inmunofilina más ampliamente distribuída, se encuentra en prácticamente todos los tejidos, en particular con alta expresión en cerebro (Steiner *et al.*, 1992). Se asocia a distintos receptores como el receptor de Rianodina (Wehrens *et al.*, 2003), el receptor de Inositol 1,4,5 trifosfato (Cameron *et al.*, 1995) y el receptor de TGF- β (Wang *et al.*, 1996). Incluso ha demostrado tener relación con la tolerancia y dependencia de morfina a través del receptor de opioides OPRM1 (McClung *et al.*, 2005). Recientemente nuestro laboratorio ha descubierto una posible función fuera de la célula, ya que se ha observado en el medio extracelular en condiciones de alta glucosa en células pancreáticas (Sandoval, 2014). Bajo estas circunstancias, las células se encuentran en secreción activa de insulina (German *et al.*, 1990; Docherty y Clark, 1994).

Tratando de dilucidar mecanismos alternativos para explicar los efectos adversos de Tacrolimus, hemos descubierto que este inmunosupresor es capaz de modular la expresión de algunas inmunofilinas en linfocitos, páncreas (Sandoval, 2014) y en

células de Sertoli (Cutiño, 2011). Hasta ahora no se había estudiado el efecto de este fármaco sobre las inmunofilinas en las células renales HK-2.

Nuestros hallazgos presentes confirman lo estudiado anteriormente por nuestro laboratorio, en esta investigación vemos que Tacrolimus es capaz de modular la expresión de FKBP12 en células HK-2, pues a diferentes tiempos ocurre un aumento respecto al control DMSO, llegando a su máximo en 30 minutos de tratamiento con un aumento de 20%. No obstante, la expresión génica de esta proteína se mantiene constante o disminuye hasta 40% a las 3 horas. Al comparar estos resultados con otros tipos celulares, observamos el mismo patrón, disminuye la expresión del ARN mensajero y aumenta la cantidad de proteína (Cutiño, 2011; Sandoval, 2014). La similitud con estos antecedentes sugiere que Tacrolimus podría inhibir la secreción de FKBP12 hacia el medio extracelular, ya que una forma en que aumente la cantidad de proteína intracelular a pesar de que disminuye el ARN mensajero, es que ésta se acumule al interior de la célula.

Si bien en este estudio podemos dar cuenta de dos efectos de Tacrolimus (secuestrar a FKBP12 y modular su expresión), para comprobar con mayor certeza el efecto inhibitorio de la secreción de Tacrolimus, tendríamos que evaluar a través de Western blot la cantidad de FKBP12 en el medio de cultivo de las células tratadas con Tacrolimus, esperando que en presencia del fármaco se disminuya la cantidad de FKBP12 en el medio extracelular (Sandoval, 2014).

Dentro de variados Factores de Transcripción que se pueden asociar a Smad, se ha reportado la interacción y cooperación con ETS1 (Lindemann *et al.*, 2001; Koinuma

et al., 2009). ETS1 (*v-ets avian erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1*) es un factor de transcripción perteneciente a la familia de dominios ETS (*v-ets avian erythroblastosis virus E26*) inducido por varios factores de crecimiento. Se le han descrito roles en desarrollo, angiogénicos, anti o pro apoptóticos, entre otros (Dittmer, 2003). Este Factor de Transcripción se une y trabaja cooperativamente con Smad, regulando varios genes específicos de la señalización de TGF- β (Koinuma *et al.*, 2009).

Interesantemente, en un estudio genómico del gen que codifica para FKBP12, se descubrió un sitio de consenso de ETS1, al que luego se le comprobó su funcionalidad mediante EMSA y genes reporteros (Nakazawa *et al.*, 2005). Se ha descrito que la señalización de TGF- β se autoregula negativamente, promoviendo la transcripción de moléculas represoras como Smad7 (Afrakhte *et al.*, 1998; Yan *et al.*, 2009; Huang y Chen 2012). Con estos antecedentes podemos esperar que la expresión de FKBP12 estaría regulada positivamente por TGF- β . Sin embargo, nuestros resultados mostraron que el ARN mensajero de FKBP12 disminuye en condiciones en que aumenta la fosforilación de Smad2/3, lo cual podría ser porque p-Smad2/3 une y secuestra al factor de transcripción ETS1 llevándolo fuera del promotor de FKBP12.

La cantidad y versatilidad de FKBP's es bastante amplia, están involucradas en varios procesos y se encuentran en todo tipo celular. Su actividad peptidil prolil isomerasa (PPIasa) les brinda la capacidad de catalizar la isomerización de residuos prolina entre sus configuraciones *cis* y *trans*, obteniendo una participación importante en el correcto plegamiento de otras proteínas (Schiene y Fischer 2000). Adicionalmente se conocen varias inmunofilinas funcionando como chaperonas, por ejemplo FKBP51 y

FKBP52 se unen a Hsp90 a través de sus dominios TPR (Galat 2003), FKBP25 interactúa con la proteína caseína quinasa II y nucleolina (Jin y Burakoff, 1993) y FKBP38 que se asocia y protege a la proteína Bcl-2 (Shirane y Nakayama 2003; Kang *et al.*, 2005)

A nivel celular destaca la función que realizan las inmunofilinas en la vía secretoria. Por una parte se encuentra FKBP13 que se asocia a BIG1 (*Brefeldin A Inhibited GEF 1*) (Padilla *et al.*, 2003), este es un intercambiador de nucleótidos de guanina (*Guanine Nucleotide Exchange Factor*, GEF) que participa en la activación de ARF (*ADP Ribosylation Factors*), una proteína que une GTP involucrada en transporte vesicular (Pasqualato *et al.*, 2002; Spang *et al.*, 2010). Dentro de los GEFs también se encuentra GBF1 (*Golgi Brefeldin A Resistant GEF 1*) que posee un dominio DCB involucrado en dimerización y unión a ciclofilinas (Grebe *et al.*, 2000; Claude *et al.*, 2003; Ramaen *et al.*, 2007), que podría estar interactuando con una o más inmunofilinas. Otra inmunofilina de la vía secretoria es FKBP65, la que se asocia principalmente con una proteína llamada Tropoelastina y la acompaña en todo el camino hacia la matriz extracelular donde ejerce su función (Davis *et al.*, 1998). Esta interacción se produce exclusivamente durante el crecimiento y desarrollo de tejidos, no se ha observado en tejidos adultos (Patterson *et al.*, 2000). También en la vía secretoria se encuentra FKBP19, la cual es exclusiva de vertebrados, se expresa mayormente en tejidos altamente secretores como páncreas, estómago, riñón entre otros (Rulten *et al.*, 2006) por lo que se cree que es fundamental para el tránsito en la vía secretoria.

A nivel renal, se ha registrado la expresión de varias inmunofilinas, algunos ejemplos importantes son FKBP12 y FKBP 51 (Baugman *et al.*, 1997), FKBP52 (Peattie *et al.*, 1992), FKBP38 (Lam *et al.*, 1995), FKBP19 (Rulten *et al.*, 2006) y recientemente, FKBP25 (Schreiber *et al.*, 2015). Debido a la gran variedad de funciones y expresión de las FKBP's que podrían estar afectando la interacción de Tacrolimus en la célula, no ha sido posible describir un mecanismo concreto, como es el caso del mecanismo de bloqueo de secreción propuesto por nuestro laboratorio, que explique los efectos secundarios de este fármaco, siendo necesario continuar investigando tanto a nivel celular como molecular e involucrando más inmunofilinas.

Las estrategias de genómica o proteómica actualmente en boga permitirían estudiar la gran diversidad de inmunofilinas que podrían ser afectadas por estos inmunosupresores tanto en tejido renal como en otros órganos afectados por FK506. Otra estrategia que podría entregar respuestas respecto al mecanismo de bloqueo de la vía secretoria por Tacrolimus, es utilizar *imaging*, en estudios similares a los realizados para estudiar el efecto de bloqueo de secreción por BFA. Otra alternativa sería utilizando proteínas marcadoras residentes de cada compartimento de la ruta secretoria, por ejemplo: GM130 (proteína residente de *cis* Golgi), TGN46 (proteína residente de *trans* Golgi), EEA1 (proteína endosomal). Con estos marcadores, realizar una serie de inmunofluorescencias indirectas, inmunodetectando una proteína que transite por la vía secretoria, como IL-2 junto a cada marcador, y observar colocalización de ambas señales. Al identificar dos señales en la misma localización provocado por FK506, sería sugerente de un bloqueo a ese nivel. Estos y otros experimentos se pueden realizar aplicando los conocimientos aquí adquiridos respecto

metodología (tiempos de incubación previa, tiempos de tratamiento, etc.) para finalmente poder describir uno o varios mecanismos que expliquen los efectos adversos del tratamiento con Tacrolimus y así buscar estrategias para evitarlos o disminuir su intensidad, llevando a la gran cantidad de pacientes que utilizan este fármaco a una mejor calidad de vida.

Para finalizar, con todos los antecedentes presentados y descritos en esta investigación, podemos proponer un modelo para el efecto nefrotóxico de Tacrolimus, el que a través del secuestro de FKBP12 suscita la activación del Receptor I de TGF- β (**Figura 10**) promoviendo la señalización correspondiente que culmina aumentando factores fibróticos que llevan a importante daño renal.

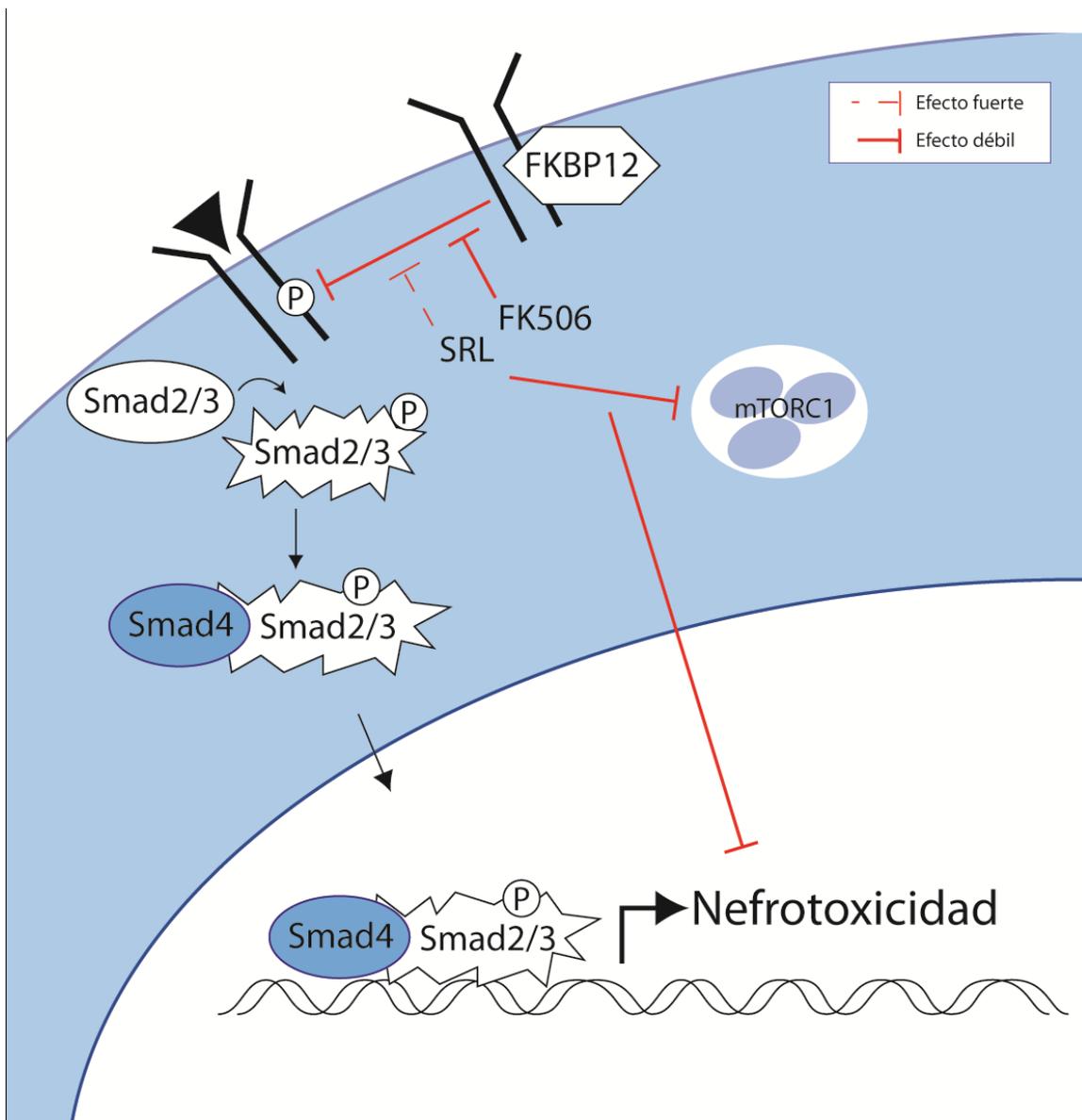


Figura 10. Esquema de posible mecanismo nefrotóxico inducido por FK506 activando la vía de TGF-β/Smad. La liberación de FKBP12 desde el sitio GS de TβRI permite la fosforilación de esta región por TβRII cuando se une TGF-β, activando la quinasa que fosforila a Smad2/3. p-Smad2/3 (Smad2/3 fosforilado) se une a Smad4 y translocan al núcleo regulando la transcripción génica que finalmente induce fibrosis y por tanto nefrototoxicidad. Este proceso sería inducido por FK506 (Tacrolimus) que

secuestra FKBP12, activando la señalización sin necesidad de ligando. SRL (Rapamicina) tiene un efecto débil comparado con FK506 y bloquearía el efecto nefrotóxico a través de la inhibición a mTORC1 (*mammalian Target of Rapamycin Complex 1*).

6. REFERENCIAS

Abbas, A. K., Lichtman, A. H. and Pillai, S. (2012) Basic immunology: Functions and disorders of the immune system. 4th Ed. Elsevier, Philadelphia. pp. 336.

Abraham, R. T. (1998) Mammalian Target of Rapamycin: Immunosuppressive drugs uncover a novel pathway of cytokine receptor signaling. *Curr Opin Immunol.* 10, 330-336.

Abraham, R. T. and Wiederrecht, G. J. (1996) Immunopharmacology of Rapamycin 1. *Annu Rev Immunol.* 14, 483-510.

Afrakhte, M., Morén, A., Jossan, S., Itoh, S., Sampath, K., Westermarck, B., Heldin, C. H., Heldin, N. E. and ten Dijke, P. (1998) Induction of inhibitory Smad6 and Smad7 mRNA by TGF- β family members. *Biochem Biophys Res Commun.* 249, 505-511.

Aghdasi, B., Ye, K., Resnick, A., Huang, A., Ha, H. C., Guo, X., Dawson, T. M., Dawson, V. L. and Snyder, S. H. (2001) FKBP12, the 12-kDa FK506-binding protein, is a physiologic regulator of the cell cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98, 2425-2430.

Ahearn, I. M., Tsai, F. D., Court, H., Zhou, M., Jennings, B. C., Ahmed, M., Fehrenbacher, N., Linder, M. E. and Philips, M. R. (2011) FKBP12 binds to acylated H-

Ras and promotes depalmitoylation. *Mol Cell.* 41, 173-185.

Alkhatib, A. A. (2006) Sirolimus-induced intractable chronic diarrhea: A case report. *Transplant Proc.* 38, 1298-1300.

Alessiani, M., Cillo, U., Fung, J. J., Irish, W., Abu-Elmagd, K., Jain, A., Takaya, S., Van Thiel, D. and Starzl, T. E. (1993) Adverse effects of FK506 overdosage after liver transplantation. *Transplant Proc.* 25, 628-634.

Allison, A. C. (2000) Immunosuppressive drugs: the first 50 years and a glance forward. *Immunopharmacology.* 47, 63-83.

Andreoni, K. A., Brayman, K. L., Guidinger, M. K., Sommers, C. M. and Sung, R. S. (2007) Kidney and pancreas transplantation in the United States, 1996-2005. *Am J Transplant.* 7, 1359-1375.

Arakawa, H., Nagase, H., Hayashi, N., Fujiwara, T., Ogawa, M., Shin, S. and Nakamura, Y. (1994) Molecular cloning and expression of a novel human gene that is highly homologous to human FK506-binding protein 12kDa (hFKBP-12) and characterization of two alternatively spliced transcripts. *Biochem Biophys Res Commun.* 200, 836-843.

Avallet, O., Vigier, M., Leduque, P., Dubois, P. M. and Saez, J. M. (1994) Expression and regulation of transforming growth factor- β 1 messenger ribonucleic acid and protein

in cultured porcine Leydig and Sertoli cells. *Endocrinology*. 134, 2079-2087.

Axelrod, D. A., McCullough, K. P., Brewer, E. D., Becker, B. N., Segev, D. L. and Rao, P. S. (2010) Kidney and pancreas transplantation in the United States, 1999-2008: The changing face of living donation. *Am J Transplant*. 10, 987-1002.

Baker, H., Sidorowicz, A., Sehgal, S. N. and Vézina, C. (1978) Rapamycin (ay-22,989), a new antifungal antibiotic. III. In vitro and in vivo evaluation. *J Antibiot*. 31, 539-545.

Baughman, G., Wiederrecht, G. J., Chang, F., Martin, M. M. and Bourgeois, S. (1997) Tissue distribution and abundance of human FKBP51, and FK506-binding protein that can mediate Calcineurin inhibition. *Biochem Biophys Res Commun*. 232, 437-443.

Bennett, W. M., DeMattos, A., Meyer, M. M., Andoh, T. and Barry, J. M. (1996) Chronic Cyclosporin A nephropathy: The achilles' heel of immunosuppressive therapy. *Kidney Int*. 50, 1089-1100.

Bernabeu, C., Lopez-Novoa, J. M. and Quintanilla, M. (2009) The emerging role of TGF- β superfamily coreceptors in cancer. *Biochim Biophys Acta*. 1792, 954-973.

Bierer, B. E., Mattila, P. S., Standaert, R. F., Herzenberg, L. A., Burakoff, S. J., Crabtree, G. and Schreiber, S. L. (1990) Two distinct signal transmission pathways in T lymphocytes are inhibited by complexes formed between an immunophilin and either

FK506 or Rapamycin. *PNAS*. 87, 9231-9235.

Blanco, F. J., Santibanez, J. F., Guerrero-Esteo, M., Langa, C., Vary, C. P. and Bernabeu, C. (2005) Interaction and functional interplay between endoglin and alk-1, two components of the endothelial transforming growth factor-beta receptor complex. *J Cell Physiol*. 204, 574-584.

Boland, E. W. and Headley, N. E. (1949) Effects of cortisone acetate on rheumatoid arthritis. *JAMA*. 141, 301-308.

Brillantes, A. M. B., Ondrias, K., Scott, A., Kobrinsky, E., Ondriašová, E., Moschella, M. C., Jayaraman, T., Landers, M., Ehrlich, B. E. and Marks, A. R. (1994) Stabilization of calcium release channel (ryanodine receptor) function by FK506-binding protein. *Cell*. 77, 513-523.

Cameron, A. M., Steiner, J. P., Roskams, A. J., Ali, S. M. and Snyder, S. H. (1995) Calcineurin associated with the inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor-FKBP12 complex modulates Ca²⁺ flux. *Cell*. 83, 463-472.

Castagna, M., Takai, Y., Kaibuchi, K., Sano, K., Kikkawa, U. and Nishizuka, Y. (1982) Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *J Biol Chem*. 257, 7847-7851.

Chabner, B. A., Allegra, C. J., Curt, G. A. and Calabresi, P. (1996). Antineoplastic agents in Hardman, J. G. and Limbird, L. E., (ed) Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics: 1233-1287. McGraw-Hill, New York.

Chen, G., Chen, H., Wang, C., Peng, Y., Sun, L., Liu, H. and Liu, F. (2012) Rapamycin ameliorates kidney fibrosis by inhibiting the activation of mTOR signaling in interstitial macrophages and myofibroblasts. *PLoS One*. 7, e33626-e33626.

Chen, Y. G., Liu, F. and Massague, J. (1997) Mechanism of TGF- β receptor inhibition by FKBP12. *EMBO J*. 16, 3866-3876.

Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 162, 156-159.

Claude, A., Zhao, B.-P. and Melançon, P. (2003) Characterization of alternatively spliced and truncated forms of the Arf guanine nucleotide exchange factor GBF1 defines regions important for activity. *Biochem Biophys Res Commun*. 303, 160-169.

Clipstone, N. A. and Crabtree, G. R. (1992) Identification of Calcineurin as a key signalling enzyme in T-lymphocyte activation. *Nature*. 357, 695-697.

Collins, J. H. (1991) Sequence analysis of the ryanodine receptor: Possible association with a 12k, FK506-binding immunophilin/protein kinase c inhibitor. *Biochem Biophys Res*

Commun. 178, 1288-1290.

Cutiño, A. (2011) Efecto de FK506 en la secreción de TGF- β en células de Sertoli y su relación con la expresión diferencial de FKBP. Tesis de pregrado, Escuela de Tecnología Médica, Facultad de Medicina, Univ. Austral de Chile, 68 pp.

Davis, E. C. (2000). FK506-binding proteins in the secretory pathway. in Gold, B. G., Fischer, G. and Herdegen, T., (ed) Immunophilins in the brain. FKBP ligands: Novel strategies for the treatment of neurodegenerative disorders: 59-66. Prous Science, S.A., Barcelona.

Davis, E. C., Broekelmann, T. J., Ozawa, Y. and Mecham, R. P. (1998) Identification of tropoelastin as a ligand for the 65-kd FK506-binding protein, FKBP65, in the secretory pathway. *J Cell Biol.* 140, 295-303.

de Caestecker, M. (2004) The transforming growth factor- β superfamily of receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.* 15, 1-11.

Dennler, S., Itoh, S., Vivien, D., ten Dijke, P., Huet, S. and Gauthier, J. M. (1998) Direct binding of Smad3 and Smad4 to critical TGF- β -inducible elements in the promoter of human plasminogen activator inhibitor-type 1 gene. *EMBO J.* 17, 3091-3100.

Dittmer, J. (2003) The biology of the ETS1 proto-oncogene. *Mol Cancer.* 2, 29-29.

Docherty, K. and Clark, A. R. (1994) Nutrient regulation of insulin gene expression. .
FASEB J. 8, 20-27.

Drachenberg, C. B., Klassen, D. K., Weir, M. R., Wiland, A., Fink, J. C., Bartlett, S. T.,
Cangro, C. B., Blahut, S. and Papadimitriou, J. C. (1999) Islet cell damage associated
with Tacrolimus and Cyclosporin A: Morphological features in pancreas allograft
biopsies and clinical correlation. *Transplant.* 68, 396-402.

Dumont, F. J., Staruch, M. J., Koprak, S. L., Melino, M. R. and Sigal, N. H. (1990)
Distinct mechanisms of suppression of murine T cell activation by the related macrolides
FK506 and Rapamycin. *J Immunol.* 144, 251-258.

Elliott, J. F., Lin, Y., Mizel, S. B., Bleackley, R. C., Harnish, D. G. and Paetkau, V. (1984)
Induction of Interleukin 2 messenger RNA inhibited by Cyclosporin A. *Science.* 226,
1439-1441.

First, M. R., Neylan, J. F., Rocher, L. L. and Tejani, A. (1994) Hypertension after renal
transplantation. *J Am Soc Nephrol.* 4, S30-S30.

Fischereder, M. and Kretzler, M. (2004) New immunosuppressive strategies in renal
transplant recipients. *J Nephrol.* 17, 9-18.

Fruman, D. A., Klee, C. B., Bierer, B. E. and Burakoff, S. J. (1992) Calcineurin

phosphatase activity in T lymphocytes is inhibited by FK506 and Cyclosporin A. *PNAS*. 89, 3686-3690.

Galat, A. (2003) Peptidylprolyl cis trans isomerases (immunophilins): Biological diversity-targets-functions. *Curr Top Med Chem*. 3, 1315-1347.

Gatza, C. E., Oh, S. Y. and Blobel, G. C. (2010) Roles for the type III TGF- β receptor in human cancer. *Cell Signal*. 22, 1163-1174.

German, M. S., Moss, L. G. and J., R. W. (1990) Regulation of insulin gene expression by glucose and calcium in transfected primary islet cultures. *J Biol Chem*. 265, 22063-22066.

Giordano, A., Romano, S., Mallardo, M., D'Angelillo, A., Cali, G., Corcione, N., Ferraro, P. and Romano, M. F. (2008) FK506 can activate transforming growth factor-beta signalling in vascular smooth muscle cells and promote proliferation. *Cardiovasc Res*. 79, 519-526.

Grebe, M., Gadea, J., Steinmann, T., Kientz, M., Rahfeld, J. U., Salchert, K., Koncz, C. and Jürgens, G. (2000) A conserved domain of the arabidopsis GMON protein mediates subunit interaction and Cyclophilin 5 binding. *Plant Cell*. 12, 343-356.

Greenwald, J., Fischer, W. H., Vale, W. W. and Choe, S. (1999) Three-finger toxin fold

for the extracellular ligand-binding domain of the type II Activin receptor serine kinase. *Nature Struct Biol.* 6, 18-22.

Ha, H., Yu, M. R. and Lee, H. B. (2001) High glucose-induced PKC activation mediates tgf-b1 and fibronectin synthesis by peritoneal mesothelial cells. *Kidney Int.* 59, 463-470.

Harding, M. W., Galat, A., Uehling, D. E. and Schreiber, S. L. (1989) A receptor for the immuno-suppressant FK506 is a *cis-trans* peptidyl-prolyl isomerase. *Nature.* 341, 758-760.

Hay, N. and Sonenberg, N. (2004) Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev.* 18, 1926-1945.

Heldin, C. H., Miyazono, K. and Ten Dijke, P. (1997) TGF- β signalling from cell membrane to nucleus through Smad proteins. *Nature.* 390, 465-471.

Hoitsma, A. J. and Hilbrands, L. B. (2006) Relative risk of new-onset diabetes during the first year after renal transplantation in patients receiving Tacrolimus or Cyclosporin A immunosuppression. *Clin Transpl.* 20, 659-664.

Huang, F. and Chen, Y. G. (2012) Regulation of TGF- β receptor activity. *Cell Biosci.* 2, 9-9.

Huse, M., Muir, T. W., Xu, L., Chen, Y. G., Kuriyan, J. and Massagué, J. (2001) The TGF- β receptor activation process: An inhibitor-to substrate-binding switch. *Mol Cell*. 8, 671-682.

Iglesias-de la Cruz, M. C., Ruiz-Torres, P., Alcami, J., Diez-Marques, L., Ortega-Velazquez, R., Chen, S., Rodríguez-Puyol, M., Ziyadeh, F. N. and Rodríguez-Puyol, D. (2001) Hydrogen peroxide increases extracellular matrix mRNA through TGF- β in human mesangial cells. *Kidney Int*. 59, 87-95.

Ishikawa, K., Nagase, T., Suyama, M., Miyajima, N., Tanaka, A., Kotani, H., Nomura, N. and Ohara, O. (1998) Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. X. The complete sequences of 100 new cDNA clones from brain which can code for large proteins in vitro. *DNA Res*. 5, 169-176.

Jain, A., Brody, D., Hamad, I., Rishi, N., Kanal, E. and Fung, J. (2000) Conversion to neoral for neurotoxicity after primary adult liver transplantation under Tacrolimus. *Transplant*. 69, 172-176.

Janeway, C. A., Travers, P. and Walport, M. (2001) Immunobiology: The immune system in health and disease. 5th Ed. Garland Science, New York. pp. 732.

Jin, Y. J. and Burakoff, S. J. (1993) The 25-kDa FK506-binding protein is localized in the nucleus and associates with casein kinase II and nucleolin. *PNAS*. 90, 7769-7773.

Jin, Y. J., Burakoff, S. J. and Bierer, B. E. (1992) Molecular cloning of a 25-kDa high affinity Rapamycin binding protein, FKBP25. *J Biol Chem.* 267, 10942-10945.

Kahan, B. D. (1987) Immunosuppressive therapy, 1987. *Tex Heart Inst J.* 14, 351-351.

Kang, C. B., Feng, L., Chia, J. and Yoon, H. S. (2005) Molecular characterization of FK506 binding protein 38 and its potential regulatory role on the anti-apoptotic protein bcl-2. *Biochem Biophys Res Commun.* 337, 30-38.

Kang, J. S., Liu, C. and Derynck, R. (2009) New regulatory mechanisms of TGF- β receptor function. *Trends Cell Biol.* 19, 385-394.

Kanzaki, T., Olofsson, A., Morén, A., Wernstedt, C., Hellman, U., Miyazono, K., Claesson-Welsh, L. and Heldin, C. H. (1990) TGF- β 1 binding protein: A component of the large latent complex of TGF- β 1 with multiple repeat sequences. *Cell.* 61, 1051-1061.

Kern, G., Mair, S. M., Noppert, S. J., Jennings, P., Schramek, H., Rudnicki, M., Mueller, G. A., Mayer, G. and Koppelstaetter, C. (2014) Tacrolimus increases Nox4 expression in human renal fibroblasts and induces fibrosis-related genes by aberrant TGF- β receptor signalling. *PLoS One.* 9, e96377-e96377.

Khanna, A., Plummer, M., Bromberek, C., Bresnahan, B. and Hariharan, S. (2002) Expression of TGF- β and fibrogenic genes in transplant recipients with Tacrolimus and

Cyclosporin A nephrotoxicity. *Kidney Int.* 62, 2257-2263.

Kino, T., Hatanaka, H., Hashimoto, M., Nishiyama, M., Goto, T., Okuhara, M., Kohsaka, M., Aoki, H. and Imanaka, H. (1987) Fk-506, a novel immunosuppressant isolated from a *Streptomyces*. I. Fermentation, isolation, and physico-chemical and biological characteristics. *J Antibiot*, 40, 1249-1255.

Klausner, R. D., Donaldson, J. G. and Lippincott-Schwartz, J. (1992) Brefeldin A: Insights into the control of membrane traffic and organelle structure. *J Cell Biol.* 116, 1071-1080.

Knight, D. M., Trinh, H., Le, J., Siegel, S., Shealy, D., McDonough, M., Scallon, B., Arevalo, M., Vilcek, J., Daddona, P. and Ghrayeb, J. (1993) Construction and initial characterization of a mouse-human chimeric anti-TNF antibody. *Mol Immunol.* 30, 1443-1453.

Koinuma, D., Tsutsumi, S., Kamimura, N., Taniguchi, H., Miyazawa, K., Sunamura, M., Imamura, T., Miyazono, K. and Aburatani, H. (2009) Chromatin immunoprecipitation on microarray analysis of Smad2/3 binding sites reveals roles of ETS1 and TFAP2A in transforming growth factor beta signaling. *Mol Cell Biol.* 29, 172-186.

Kondou, H., Mushiake, S., Etani, Y., Miyoshi, Y., Michigami, T. and Ozono, K. (2003) A blocking peptide for transforming growth factor- β 1 activation prevents hepatic fibrosis in

vivo. *J Hepatol.* 39, 742-748.

Lam, E., Martin, M. M. and Wiederrecht, G. J. (1995) Isolation of a cDNA encoding a novel human FK506-binding protein homolog containing leucine zipper and tetratricopeptide repeat motifs. *Gene.* 160, 297-302.

Lan, C. C., Fang, A. H., Wu, P. H. and Wu, C. S. (2014) Tacrolimus abrogates TGF- β 1-induced type I collagen production in normal human fibroblasts through suppressing p38MAPK signalling pathway: Implications on treatment of chronic atopic dermatitis lesions. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 28, 204-215.

Liao, W., Lin, J. X. and Leonard, W. J. (2011) IL-2 family cytokines: New insights into the complex roles of IL-2 as a broad regulator of T helper cell differentiation. *Curr Opin Immunol.* 23, 598-604.

Lindemann, R. K., Ballschmieter, P., Nordheim, A. and Dittmer, J. (2001) Transforming growth factor beta regulates parathyroid hormone-related protein expression in MDA-mb-231 breast cancer cells through a novel Smad/ETS synergism. *J Biol Chem.* 276, 46661-46670.

Liu, C. F., Liu, H., Fang, Y., Jiang, S. H., Zhu, J. M. and Ding, X. Q. (2014) Rapamycin reduces renal hypoxia, interstitial inflammation and fibrosis in a rat model of unilateral ureteral obstruction. *Clin Invest Med.* 37, 142-153.

Liu, F., Pouponnot, C. and Massague, J. (1997) Dual role of the Smad4/DPC4 tumor suppressor in TGF- β -inducible transcriptional complexes. *Genes Dev.* 11, 3157-3167.

Liu, J., Farmer, J. D., Lane, W. S., Friedman, J., Weissman, I. and Schreiber, S. L. (1991) Calcineurin is a common target of Cyclophilin-Cyclosporin and FKBP-FK506 complexes. *Cell.* 66, 807-815.

Maloney, D. G., Grillo-López, A. J., White, C. A., Bodkin, D., Schilder, R. J., Neidhart, J. A., Janakiraman, N., Foon, K. A., Liles, T. M., Dallaire, B. K., Wey, K., Royston, I., Davis, T. and Levy, R. (1997) Idec-c2b8 (rituximab) anti-CD20 monoclonal antibody therapy in patients with relapsed low-grade non-hodgkin's lymphoma. *Blood.* 90, 2188-2195.

Maltzman, J. S. and Koretzky, G. A. (2003) Azathioprine: Old drug, new actions. *J Clin Invest.* 111, 1122.

Martin, S. R., Atkison, P., Anand, R. and Lindblad, A. S. (2004) Studies of pediatric liver transplantation 2002: Patient and graft survival and rejection in pediatric recipients of a first liver transplant in the United States and Canada. *Pediatr Transplant.* 8, 273-283.

Matzinger, P. (2002) The danger model: A renewed sense of self. *Science.* 296, 301-305.

McCauley J, Farkas Z, Prasad S, Plummer H, Starzl T. and S., M. (1991) Cyclosporin A

A and FK506 induced inhibition of renal cell (LLC-PKI) proliferation in culture. *Transplant Proc.* 23, 2829-2830.

McClung, C. A., Nestler, E. J. and Zachariou, V. (2005) Regulation of gene expression by chronic morphine and morphine withdrawal in the locus ceruleus and ventral tegmental area. *J Neurosci.* 25, 6005-6015.

Meng, X., Lu, X., Morris, C. A. and Keating, M. T. (1998) A novel human gene FKBP6 is deleted in Williams syndrome. *Genomics.* 52, 130-137.

Morales, J. M., Andres, A., Rengel, M. and Rodicio, J. L. (2001) Influence of Cyclosporin, Tacrolimus and Rapamycin on renal function and arterial hypertension after renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant.* 16, 121-124.

Munger, J. S., Harpel, J. G., Gleizes, P. E., Mazzieri, R., Nunes, I. and Rifkin, D. B. (1997) Latent transforming growth factor-beta: Structural features and mechanisms of activation. *Kidney Int.* 51, 1376-1382.

Myers, B. D., Ross, J., Newton, L., Luetscher, J. and Perlroth, M. (1984) Cyclosporin A-associated chronic nephropathy. *N Engl J Med.* 311, 699-705.

Nair, S. C., Rimerman, R. A., Toran, E. J., Chen, S., Prapapanich, V., Butts, R. N. and Smith, D. F. (1997) Molecular cloning of human FKBP51 and comparisons of

immunophilin interactions with hsp90 and progesterone receptor. *Mol and Cellular Biology*. 17, 594-603.

Nakamura, T., Ebihara, I., Fukui, M., Tomino, Y. and Koide, H. (1995) Effect of a specific endothelin receptor antagonist on mRNA levels for extracellular matrix components and growth factors in diabetic glomeruli. *Diabetes*. 44, 895-899.

Nakazawa, T., Takasawa, S., Noguchi, N., Nata, K., Tohgo, A., Mori, M., Nakagawara, K., Akiyama, T., Ikeda, T., Yamaguchi, A., Takahashi, I., Yoshikawa, T. and Okamoto, H. (2005) Genomic organization, chromosomal localization, and promoter of human gene for FK506-binding protein 12.6. *Gene*. 360, 55-64.

Nazir, S., Kumar, A., Chatterjee, I., Anbazhagan, A. N., Gujral, T., Priyamvada, S., Saksena, S., Alrefai, W. A., Dudeja, P. K. and Gill, R. K. (2015) Mechanisms of intestinal serotonin transporter (sert) upregulation by TGF- β 1 induced non-Smad pathways. *PLoS One*. 10, e0120447-e0120447.

Norman, D. J. (1995) Mechanisms of action and overview of OKT3. . *Ther Drug Monit*. 17, 615-620.

Oetjen, E., Baun, D., Beimesche, S., Krause, D., Cierny, I., Blume, R., Dickel C, Wehner Sand Knepel, W. (2003) Inhibition of human insulin gene transcription by the immunosuppressive drugs Cyclosporin A and Tacrolimus in primary, mature islets of

transgenic mice. *Mol Pharmacol.* 63, 1289-1295.

Osman, B., Doller, A., Akool el, S., Holdener, M., Hintermann, E., Pfeilschifter, J. and Eberhardt, W. (2009) Rapamycin induces the TGF- β 1/Smad signaling cascade in renal mesangial cells upstream of mTOR. *Cell Signal.* 21, 1806-1817.

Ozbay, L. A., Smidt, K., Mortensen, D. M., Carstens, J., Jorgensen, K. A. and Rungby, J. (2011) Cyclosporin and Tacrolimus impair insulin secretion and transcriptional regulation in INS-1e beta-cells. *Br J Pharmacol.* 162, 136-146.

Ozdemir, B. H., Ozdemir, A. A., Erdal, R., Ozdemir, F. N. and Haberal, M. (2011) Rapamycin prevents interstitial fibrosis in renal allografts through decreasing angiogenesis and inflammation. *Transplant Proc.* 43, 524-526.

Padilla, P. I., Chang, M. J., Pacheco-Rodriguez, G., Adamik, R., Moss, J. and Vaughan, M. (2003) Interaction of FK506-binding protein 13 with Brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein 1 (BIG1): Effects of FK506. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100, 2322-2327.

Pasqualato, S., Renault, L. and Cherfils, J. (2002) Arf, Arl, Arp and Sar proteins: A family of GTP-binding proteins with a structural device for 'front-back' communication. *EMBO reports.* 3, 1035-1041.

Patterson, C. E., Gao, J., Rooney, A. P. and Davis, E. C. (2002) Genomic organization of mouse and human 65 kDa FK506-binding protein genes and evolution of the FKBP multigene family. *Genomics*. 79, 881-889.

Patterson, C. E., Schaub, T., Coleman, E. J. and Davis, E. C. (2000) Developmental regulation of FKBP65. An ER-localized extracellular matrix binding-protein. *Mol biology of the cell*. 11, 3925-3935.

Peattie, D. A., Harding, M. W., Fleming, M. A., DeCenzo, M. T., Lippke, J. A., Livingston, D. J., and Benasutti, M. (1992) Expression and characterization of human FKBP52, an immunophilin that associates with the 90-kDa heat shock protein and is a component of steroid receptor complexes. *PNAS*. 89, 10974-10978.

Pelham, H. R. (1991) Multiple targets for Brefeldin A. *Cell*. 67, 449-451.

Peralta, O., Lagunas, A. and Madrid, V. (2001) Transforming growth factor beta-1: Structure, function, and regulation mechanisms in cancer. *Salud Publica Mex*. 43, 340-351.

Platz, K. P., Mueller, A. R., Blumhardt, G., Bachmann, S., Bechstein, W. O., Kahl, A. and Neuhaus, P. (1994) Nephrotoxicity following orthotopic liver transplantation. *Transplant*. 58, 170-178.

Porayko, M. K., Textor, S. C., Krom, R. A., Hay, J. E., Gores, G. J., Richards, T. M., Crotty P. H., Beaver S. J., L., S. J. and Wiesner, R. H. (1994) Nephrotoxic effects of primary immunosuppression with FK506 and Cyclosporin A regimens after liver transplantation. *Mayo Clin Proc.* 69, 105-111.

Ramaen, O., Joubert, A., Simister, P., Belgareh-Touze, N., Olivares-Sanchez, M. C., Zeeh, J. C., Chantalat, S., Golinelli-Cohen, M. P., Jackson, C. L., Biou, V. and Cherfils, J. (2007) Interactions between conserved domains within homodimers in the BIG1, BIG2, and GBF1 Arf guanine nucleotide exchange factors. *J Biol Chem.* 282, 28834-28842.

Rauch, M. C., San Martin, A., Ojeda, D., Quezada, C., Salas, M., Carcamo, J. G., Yanez, A. J., Slebe, J. C. and Claude, A. (2009) Tacrolimus causes a blockage of protein secretion which reinforces its immunosuppressive activity and also explains some of its toxic side-effects. *Transpl Immunol.* 22, 72-81.

Redmon, J. B., Olson, L. K., Armstrong, M. B., Greene, M. J. and Robertson, R. P. (1996) Effects of Tacrolimus (FK506) on human insulin gene expression, insulin mRNA levels, and insulin secretion in HIT-T15 cells. *J Clin Invest.* 98, 2786-2793.

Reem, G. H., Cook, L. A. and Vilcek, J. (1983) Gamma interferon synthesis by human thymocytes and T lymphocytes inhibited by Cyclosporin A. *Science.* 221, 63-65.

Roos-van Groningen, M. C., Scholten, E. M., Lelieveld, P. M., Rowshani, A. T., Baelde, H. J., Bajema, I. M., Florquin, S., Bemelman, F. J., de Heer, E., de Fijter, J. W., Bruijn, J. A. and Eikmans, M. (2006) Molecular comparison of Calcineurin inhibitor-induced fibrogenic responses in protocol renal transplant biopsies. *J Am Soc Nephrol.* 17, 881-888.

Rulten, S. L., Kinloch, R. A., Tateossian, H., Robinson, C., Gettins, L. and Kay, J. E. (2006) The human FK506-binding proteins: Characterization of human FKBP19. *Mamm Genome.* 17, 322-331.

Ryan, M. J., Johnson, G., Kirk, J., Fuerstenberg, S. M., Zager, R. A. and Torok-Storb, B. (1994) HK-2: An immortalized proximal tubule epithelial cell line from normal adult human kidney. *Kidney Int.* 45, 48-57.

Sandoval, R. (2014) Expresión de FKBP12 y FKBP19 en células pancreáticas INS-1e tratadas con Tacrolimus. Tesis de pregrado, Escuela de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Univ. Austral de Chile, 117 pp.

Santibanez, J. F., Letamendia, A., Perez-Barriocanal, F., Silvestri, C., Saura, M., Vary, C. P., Lopez-Novoa, J. M., Attisano, L. and Bernabeu, C. (2007) Endoglin increases ENOS expression by modulating Smad2 protein levels and Smad2-dependent TGF- β signaling. *J Cell Physiol.* 210, 456-468.

Schiene, C. and Fischer, G. (2000) Enzymes that catalyse the restructuring of proteins. *Curr Opin Struct Biol.* 10, 40-45.

Schreiber, K. H., Ortiz, D., Academia, E. C., Anies, A. C., Liao, C. Y. and Kennedy, B. K. (2015) Rapamycin-mediated mTORC2 inhibition is determined by the relative expression of FK506-binding proteins. *Aging cell.* 14, 265-273.

Schreiber, S. L. (1991) Chemistry and biology of the immunophilins and their immunosuppressive ligands. *Science.* 251, 283-287.

Sehgal, S. N. (1998) Rapamune (rapa, Rapamycin, Sirolimus): Mechanism of action immunosuppressive effect results from blockade of signal transduction and inhibition of cell cycle progression. *Clin Biochem.* 31, 335-340.

Sehgal, S. N., Baker, H. and Vézina, C. (1975) Rapamycin (ay-22,989), a new antifungal antibiotic. II. Fermentation, isolation and characterization. *J Antibiot.* 28, 727-732.

Sharma, K. and Ziyadeh, F. N. (1994) Renal hypertrophy is associated with upregulation of TGF- β 1 gene expression in diabetic BB rat and NOD mouse. *Am J Physiol.* 267, 1094-1001.

Shaw, L. M., Kaplan, B. and Kaufman, D. (1996) Toxic effects of immunosuppressive drugs: Mechanisms and strategies for controlling them. *Clin Chem.* 42, 1316-1321.

Shi, Y. and Massague, J. (2003) Mechanisms of TGF- β signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell*. 113, 685-700.

Shi, Y., Wang, Y. F., Jayaraman, L., Yang, H., Massagué, J. and Pavletich, N. P. (1998) Crystal structure of a Smad MH1 domain bound to DNA: Insights on DNA binding in TGF- β signaling. *Cell*. 94, 585-594.

Shihab, F. S., Bennett, W. M., Yi, H., Choi, S. O. and Andoh, T. F. (2004) Sirolimus increases transforming growth factor-beta1 expression and potentiates chronic Cyclosporin A nephrotoxicity. *Kidney Int*. 65, 1262-1271.

Shirane, M. and Nakayama, K. I. (2003) Inherent Calcineurin inhibitor FKBP38 targets Bcl-2 to mitochondria and inhibits apoptosis. *Nat Cell Biol*. 5, 28-37.

Shou, W., Aghdasi, B., Armstrong, D. L., Guo, Q., Bao, S., Charng, M. J., Mathews L. M., Schneider M. D., Hamilton S. L. and Matzuk, M. M. (1998) Cardiac defects and altered ryanodine receptor function in mice lacking FKBP12. *Nature*. 391, 489-492.

Siekierka, J. J., Hung, S. H., Poe, M., Lin, C. S. and Sigal, N. H. (1989) A cytosolic binding protein for the immunosuppressant FK506 has peptidyl-prolyl isomerase activity but is distinct from Cyclophilin. *Nature*. 341, 755-757.

Sola, E., Lopez, V., Burgos, D., Cabello, M., Gutierrez, C., Martin, A., Peña, M. and

Gonzalez-Molina, M. (2006) Pulmonary toxicity associated with Sirolimus treatment in kidney transplantation. . *Transplant Proc.* 38, 2438-2440.

Somarelli, J. A., Lee, S. Y., Skolnick, J. and Herrera, R. J. (2008) Structure-based classification of 45 FK506-binding proteins. *Proteins.* 72, 197-208.

Spang, A., Shiba, Y. and Randazzo, P. A. (2010) Arf GAPs: Gatekeepers of vesicle generation. *FEBS Lett.* 584, 2646-2651.

Sporn, M. B. (1999) TGF- β : 20 years and counting. *Microb Infect.* 1, 1251-1253.

Standaert, R. F., Galat, A., Verdine, G. L. and Schreiber, S. L. (1990) Molecular cloning and overexpression of the human FK506-binding protein FKBP. *Nature.* 346, 671-674.

Steiner, J. P., Dawson, T. M., Fotuhi, M., Glatt, C. E., Snowman, A. M., Cohen, N. and Snyder, S. H. (1992) High brain densities of the immunophilin FKBP colocalized with Calcineurin. *Nature.* 358, 584-587.

Steinmann, B., Bruckner, P. and Superti-Furga, A. (1991) Cyclosporin A slows collagen triple-helix formation in vivo: Indirect evidence for a physiologic role of peptidyl-prolyl cis-trans-isomerase. *J Biol Chem.* 266, 1299-1303.

Strutz, F., Zeisberg, M., Renziehausen, A., Raschke, B., Becker, V., Van Kooten, C. and

Müller, G. (2001) TGF- β 1 induces proliferation in human renal fibroblasts via induction of basic fibroblast growth factor (FGF-2). *Kidney Int.* 59, 579–592.

Studer, R. K., Negrete, H., Craven, P. A. and DeRubertis, F. R. (1995) Protein kinase C signals thromboxane induced increases in fibronectin synthesis and TGF- β bioactivity in mesangial cells. *Kidney Int.* 48, 422-430.

Tocci, M. J., Matkovich, D. A., Collier, K. A., Kwok, P., Dumont, F., Lin, S., Degudicibus S., Siekierka J. J., Chin J. and Hutchinson, N. I. (1989) The immunosuppressant FK506 selectively inhibits expression of early T cell activation genes. *J of Immunol.* 143, 718-726.

Vincenti, F., Laskow, D. A., Neylan, J. F., Mendez, R. and Matas, A. J. (1996) One-year follow-up of an open-label trial of FK506 for primary kidney transplantation: A report of the U.S. multicenter FK506 kidney transplant group. *Transplant.* 61, 1576-1581.

Wang, T., Li, B. Y., Danielson, P. D., Shah, P. C., Rockwell, S., Lechleider, R. J., Martin J., Manganaro T. and Donahoe, P. K. (1996) The immunophilin FKBP12 functions as a common inhibitor of the TGF- β family type I receptors. *Cell.* 86, 435-444.

Wehrens, X. H. T., Lehnart, S. E., Huang, F., Vest, J. A., Reiken, S. R., Mohler, P. J., Sun, J., Guatimosim, S., Song, L.-S., Rosemblyt, N., D'Armiento, J. M., Napolitano, C., Memmi, M., Priori, S. G., Lederer, W. J. and Marks, A. R. (2003) FKBP12.6 deficiency

and defective calcium release channel (ryanodine receptor) function linked to exercise-induced sudden cardiac death. *Cell*. 113, 829-840.

Wheatcroft, S., Byrne, J., Thomas, M. and MacCarthy, P. (2006) Life-threatening coronary artery spasm following Sirolimus-eluting stent deployment. *J Am Coll Cardiol*. 47, 1911-1912.

Wijdicks, E. F., Dahlke, L. J. and Wiesner, R. H. (1999) Oral Cyclosporin A decreases severity of neurotoxicity in liver transplant recipients. *Neurology*. 52, 1708-1710.

Wijdicks, E. F., Wiesner, R. H. and Krom, R. A. (1995) Neurotoxicity in liver transplant recipients with Cyclosporin A immunosuppression. *Neurology*. 45, 1962-1964.

Wong, M., Mallory, G. B., Goldstein, J., Goyal, M. and Yamada, K. A. (1999) Neurologic complications of pediatric lung transplantation. *Neurology*. 53, 1542-1549.

Wrana, J. L., Attisano, L., Wieser, R., Ventura, F. and Massague, J. (1994) Mechanism of activation of the tgf- β receptor. *Nature*. 370, 341-346.

Wu, C. S., Wu, P. H., Fang, A. H. and Lan, C. C. (2012) FK506 inhibits the enhancing effects of transforming growth factor (tgf)- β 1 on collagen expression and TGF- β /Smad signalling in keloid fibroblasts: Implication for new therapeutic approach. *Br J Dermatol*. 167, 532-541.

Yakymovych, I., ten Dijke, P., Heldin, C. H. and Souchelnytskyi, S. (2001) Regulation of Smad signaling by protein kinase C. *FASEB J.* 15, 553-555.

Yamamoto, T., Noble, N. A., Cohen, A. H., Nast, C. C., Hishida, A., Gold, L. I. and Border, W. A. (1996) Expression of transforming growth factor-beta isoforms in human glomerular diseases. *Kidney Int.* 49, 461-469.

Yan, X., Liu, Z. and Chen, Y. (2009) Regulation of TGF- β signaling by Smad7. *Acta Biochim Biophys Sin.* 41, 263-272.

Yoshida, H., Nishina, H., Takimoto, H., Marengère, L. E., Wakeham, A. C., Bouchard, D., Kong Y. Y, Ohteki T, Shahinian A, Bachmann M., Ohashi P. S, Penninger J. M, Crabtree, G. and Mak, T. W. (1998) The transcription factor NF-ATC1 regulates lymphocyte proliferation and Th2 cytokine production. *Immunity.* 8, 115-124.

Ziyadeh, F. N. (2004) Mediators of diabetic renal disease: The case for TGF- β as the major mediator. *J Am Soc Nephrol.* 15, S55-S57.