



ORIGINALES

La ciclosporina A origina estrés oxidativo y disfunción mitocondrial en células tubulares renales

J. Pérez de Hornedo, G. de Arriba*, M. Calvino, S. Benito y T. Parra

Unidad de Investigación y Sección de Nefrología* del Hospital Universitario de Guadalajara. Departamento de Medicina. Universidad de Alcalá.

RESUMEN

Estudiamos el efecto de la ciclosporina A (CsA) sobre la estructura y función mitocondrial en células LLC-PK1. Las células se incubaron durante 24 horas con CsA 1 μM y se analizó la producción de anión superóxido, contenido de NAD(P)H, oxidación de cardiolipina y potencial de membrana mitocondrial; además se estudió la formación de radicales libres y el contenido de glutatión reducido intracelular. Nuestros resultados demuestran que la CsA provocó un aumento del anión superóxido mitocondrial de modo paralelo al descenso de NAD(P)H; además, se produjo oxidación de la cardiolipina de la membrana interna y un descenso del potencial de membrana mitocondrial. Finalmente, observamos un aumento de la producción de radicales libres intracelulares y un descenso del glutatión reducido. En conclusión, la CsA produce modificaciones importantes en la fisiología y estructura mitocondrial con aumento de la síntesis de especies reactivas de oxígeno y descenso de la capacidad antioxidante, hechos que podrían justificar la toxicidad celular de la droga.

Palabras clave: **Ciclosporina A. Mitocondria. Especies reactivas de oxígeno. Anión superóxido. Cardiolipina.**

CYCLOSPORIN A CAUSES OXIDATIVE STRESS AND MITOCHONDRIAL DYSFUNCTION IN RENAL TUBULAR CELLS

SUMMARY

Reactive oxygen species (ROS) have been implicated in cyclosporin A (CsA) nephrotoxicity. As mitochondria are one of the main sources of ROS in cells, we evaluated the role of CsA in mitochondrial structure and function in LLC-PK1 cells. We incubated cells with CsA 1 μM for 24 hours and studies were performed by flow cytometry and confocal microscopy. We studied mitochondrial NAD(P)H content, superoxide anion (O_2^-) production (MitoSOX Red), oxidation of cardiolipin

Correspondencia: Trinidad Parra Cid
Unidad de Investigación
Hospital Universitario de Guadalajara
C/ Donante de Sangre, s/n
19002 Guadalajara. España
E-mail: trpaci@sescam.jccm.es

of inner mitochondrial membrane (NAO) and mitochondrial membrane potential [DIOC2(3)]. We also analyzed the intracellular ROS synthesis (H2DCF-DA) and reduced glutation (GSH) of cells. Our results showed that CsA decreased NAD(P)H and membrane potential, and increased O₂⁻ in mitochondria. CsA also provoked oxidation of cardiolipin. Furthermore, CsA increased intracellular ROS production and decreased GSH content. These results suggest that CsA has crucial effects in mitochondria. CsA modified mitochondrial physiology through the decrease of antioxidant mitochondrial compounds as NAD(P)H and the dissipation of mitochondrial membrane potential and increase of oxidants such O₂⁻. Also, CsA alters lipidic structure of inner mitochondrial membrane through the oxidation of cardiolipin. These effects trigger a chain of events that favour intracellular synthesis of ROS and depletion of GSH that can compromise cellular viability. Nephrotoxic cellular effects of CsA can be explained, at least in part, through its influence on mitochondrial functionalism.

Key words: Cyclosporin A. Mitochondria. NAD(P)H. Superoxide anion. Cardiolipin. Reactive oxygen species.

INTRODUCCIÓN

La ciclosporina A (CsA) es una droga inmunosupresora ampliamente utilizada para la prevención del rechazo del trasplante, así como en el tratamiento de diversas enfermedades autoinmunes^{1,2}. Su principal efecto secundario es la nefrotoxicidad, que puede ser aguda o crónica³. La toxicidad aguda suele aparecer en las primeras semanas de tratamiento y se manifiesta por deterioro de función renal, siendo la mayoría de las veces reversible al reducir la dosis del fármaco⁴. La toxicidad crónica produce una alteración progresiva de la función renal e histológicamente se observan lesiones arteriolas, fibrosis intersticial y atrofia tubular^{5,6}.

Los mecanismos fisiopatológicos de la nefrotoxicidad por CsA han sido muy estudiados y se han implicado varios mediadores como el sistema renina-angiotensina aldosterona, factor activador de las plaquetas, endotelina y eicosanoides⁷⁻⁹. Nosotros hemos demostrado que la CsA aumenta la síntesis glomerular y la excreción urinaria de tromboxano en ratas, sugiriendo que este eicosanoide puede tener un papel relevante en la afectación renal¹⁰.

También existen estudios que implican a las especies reactivas de oxígeno (ROS) en la nefrotoxicidad provocada por la CsA¹¹⁻¹⁴. Nuestro grupo ha demostrado que los glomerulos aislados de ratas tratadas con CsA mostraron un aumento de la síntesis de anión superóxido (O₂⁻) y de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y este fenómeno sucedió de un modo paralelo al deterioro de función renal que sufrieron los animales^{10,11}. Además, cuando les suministramos el antioxidante vitamina E (Vit E) en la dieta, se evitó el deterioro de función renal y el aumento de ROS glomerular^{10,11}.

En experimentos realizados en células mesangiales humanas confirmamos que la CsA aumenta la síntesis *in vitro* de ROS y que la preincubación con Vit E neutraliza este efecto^{12,13}.

Nuestra hipótesis postula que la CsA aumenta la producción ROS que, probablemente a través de la peroxidación de lípidos de membrana, condicionan la liberación de vasoconstrictores como el tromboxano A₂ originando, en última instancia, deterioro de función renal¹⁰⁻¹⁶.

No obstante, hasta el momento no se han establecido los mecanismos íntimos por los que se produce el aumento de ROS en respuesta al tratamiento con CsA. Como las mitocondrias constituyen una de las principales fuentes de ROS en las células, nuestro objetivo ha sido investigar los efectos de la CsA sobre la función y estructura mitocondriales en células tubulares proximales porcinas (LLC-PK1) y su relación con la producción de ROS.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cultivos celulares

Se utilizaron células LLC-PK1 cultivadas en placas de 6 ó 24 pocillos (según se fueran a analizar por citometría de flujo o microscopía confocal) hasta un 80% de confluencia. Las células crecieron en un incubador a 37° C con CO₂ al 5% en medio de cultivo RPMI suplementado con un 10% de suero de ternera fetal (STF) y con antibióticos (ampicilina 125 mg/ml, cloxacilina 40 mg/ml y gentamicina 125 mg/ml). Al alcanzar la confluencia se frenó el crecimiento de los cultivos sustituyendo el medio por otro de igual com-

posición pero con 0,5% de STF. Las células fueron tratadas durante 24 horas con CsA diluida en RPMI (a partir de una solución de CsA en etanol 10^{-2} M) para obtener una concentración final de 1 μ M. Las células controles fueron tratadas solamente con etanol. Los resultados se expresaron en Unidades Arbitrarias de Fluorescencia (UAF).

Estimación del contenido mitocondrial de NAD(P)H

La cantidad de NAD(P)H está en relación con el estado redox del complejo I de la cadena de transporte electrónico mitocondrial y la oxidación del mismo refleja la liberación de electrones hacia moléculas de oxígeno provocando una interrupción del flujo normal de la cadena respiratoria y la síntesis de moléculas $O_2^{\cdot-}$. Las células emiten autofluorescencia azul de modo proporcional a su contenido en moléculas de NAD(P)H cuando son excitadas con un láser ultravioleta (360 nm)¹⁷. En nuestros experimentos, las células tratadas con CsA fueron tripsinizadas y resuspendidas en RPMI 0,5% y se adquirieron en un sorter (Facstar Plus, Becton Dickinson). Se analizó su autofluorescencia utilizando un filtro de paso de banda centrado en 450 nm tras excitación con el láser ultravioleta.

Producción mitocondrial de anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$)

El $O_2^{\cdot-}$ es el principal radical libre formado en la mitocondria. Su síntesis se determinó mediante microscopia confocal (Olympus FV 1000) utilizando la sonda fluorescente MitoSOX Red (Molecular Probes, Leiden, Holanda). La sonda atraviesa libremente las membranas celulares y es oxidada específicamente por el $O_2^{\cdot-}$ ¹⁸. Las células LLC-PK1 fueron incubadas directamente en las placas con 1 ml de solución de Hanks (HBSS, $CaCl_2$ 140 mg/dl, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 10 mg/dl y $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 10 mg/dl) y MitoSOX Red 5 μ M durante 10 minutos y se lavaron dos veces. Se analizaron excitándolas con un láser de 530 nm y recogiendo la fluorescencia de emisión con un filtro de 580 nm.

Peroxidación lipídica mitocondrial

La cardiolipina (CL) es el principal componente lipídico de la membrana interna mitocondrial y contribuye a mantener la estructura del orgánulo^{19,20}. Las células se incubaron con 1 ml de RPMI con 0,5% STF en presencia del fluorocromo afín por la cardiolipina NAO (10-N-nonyl naranja de acridina, Molecular Probes), a una concentración de 100 nM durante 10

minutos a 37° C. Tras dos lavados y excitación con un láser de 488 nm se detectó su fluorescencia a 530 nm mediante citometría de flujo (Facscan, Becton Dickinson).

Estudio del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi$ m)

El $\Delta\psi$ m es consecuencia del paso de electrones a través de la cadena respiratoria, y su interrupción provoca una disminución del mismo. El DIOC₂³ es un sustrato lipofílico catiónico (3,3'-diethyloxacarbocyanine iodide, Molecular Probes) que se emplea para detectar cambios en el potencial de membrana²¹. Difunde libremente al citosol celular y se acumula preferentemente en las mitocondrias que tienen potencial de membrana activo, emitiendo fluorescencia a 530 nm y a 575 nm; su emisión fluorescente disminuye cuando se produce alteración del potencial de membrana mitocondrial. La suspensión de células LLC-PK1 se incubó en 0,5 ml de RPMI con 0,5% STF que contenía DIOC₂³ a una concentración final de 50 nM durante 15 minutos a 37° C y CO₂ al 5%. Tras lavar dos veces, las células se analizaron mediante citometría de flujo empleando los detectores de fluorescencia correspondientes.

Producción de radicales libres intracelulares

Se utilizó H₂DCF-DA (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, Molecular Probes) que es una sonda no fluorescente que difunde libremente al interior celular como consecuencia de sus propiedades lipofílicas. Una vez en el citosol, las esterasas hidrolizan su enlace éster convirtiéndola en una sustancia hidrófoba (H₂DCF) incapaz de escapar del compartimento citosólico. Su molécula oxidada (DCF) es altamente fluorescente, por lo que permite identificar la presencia de oxidantes en el citosol mediante la medición de la fluorescencia que emiten las células tras excitación con un láser de 488 nm y que recogen los detectores correspondientes a la emisión de la fluorescencia a 530 nm²².

Estimación del contenido celular de Glutatión reducido (GSH)

Uno de los principales antioxidantes celulares es el GSH. Los compuestos de la familia de los bimanos son reactivos derivados de tioles²³, esencialmente no fluorescentes, hasta que atraviesan la membrana plasmática por difusión pasiva, y forman compuestos

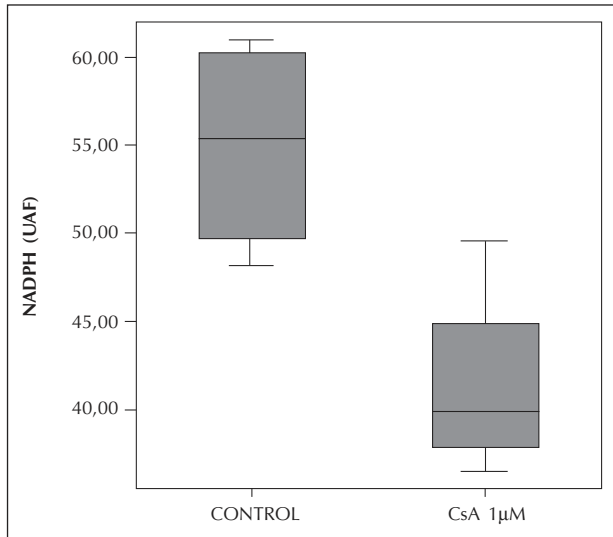


Fig. 1.—Niveles de NAD(P)H medidos como valores de autofluorescencia de las células LLC-PK1. La autofluorescencia media desciende un 24,6% en las células tratadas con CsA.

fluorescentes azules al unirse a moléculas de glutatión intracelular y a proteínas que contienen tioles. En nuestros experimentos hemos utilizado como sustrato el monobromobimano (mBB, Molecular Probes) a una concentración final de 20 mM en 1 ml de RPMI. Las células se incubaron con el reactivo en baño de agua a 37° C durante 10 minutos y después de dos lavados se analizaron mediante microscopia confocal tras ser excitadas con un láser ultravioleta a 405 nm.

Análisis estadístico

Los resultados numéricos se presentan como la media \pm una desviación estándar de al menos tres experimentos. Se compararon las medias mediante test paramétricos (*t* de Student) o no paramétricos (test de Friedman) y se consideraron estadísticamente significativos valores de *p* inferiores a 0,05.

RESULTADOS

La CsA provocó un descenso de NAD(P)H celular. Los valores de las medias de fluorescencia fueron de $55 \pm 12,3$ y de $41,5 \pm 11,3$ (UAF) para control y CsA 1 μ M respectivamente ($p < 0,05$). Los datos de cuatro experimentos están resumidos en la figura 1.

Por otro lado, la CsA provocó un aumento de la fluorescencia por célula ($39,3 \pm 2,9$ UAF) respecto de las células control ($18,3 \pm 2,4$ UAF) tras incubación

con MitoSOX Red, lo que indica un aumento de la producción de $O_2^{\cdot -}$ mitocondrial (fig. 2).

Las células tratadas con CsA mostraron una fluorescencia a 530 nm tras incubación con NAO de $159,2 \pm 116$ UAF mientras que las controles tuvieron una fluorescencia de $239,1 \pm 60,4$ UAF (fig. 3). En el histograma se observan dos poblaciones celulares, una con alta y otra con baja fluorescencia (M1). La subpoblación M1, que representa células con alto contenido en cardioplipina oxidada, fue de un 80% en las células tratadas con CsA y de un 47% en las controles (fig. 3).

La CsA indujo un descenso de la fluorescencia verde ($223,6 \pm 125,5$ UAF, fig. 4b) emitida tras incubación de las células con DIOC₂³ respecto a las células control ($481,3 \pm 170,8$ UAF, fig. 4a). Además, se pueden distinguir dos subpoblaciones celulares en función de la fluorescencia verde: las de valores más bajos (cuadrante inferior izquierdo) representa el 60% de las células tratadas con el fármaco y el 27% de las controles. Finalmente, la CsA propició la aparición de una tercera población de aproximadamente un 15% del total (marcada con línea discontinua) que tiene una fluorescencia verde intermedia; estas células además presentan fluorescencia roja disminuida, lo que podría indicar una mayor susceptibilidad a despolarizarse.

Los experimentos con DCFH-DA revelaron un aumento de la fluorescencia en las células tratadas con el fármaco (4211 UAF por célula, fig. 5b) respecto a las controles (1997 UAF por célula, fig. 5a) como consecuencia de la oxidación del sustrato por un aumento de la producción de radicales libres intracelulares. Finalmente, la tinción con monobromobimano (mBrB) mostró un mayor contenido de tioles reducidos (GSH) en las células control (2863 UAF por célula, fig. 5c) respecto a las tratadas con CsA (631 UAF por célula, fig. 5d).

DISCUSIÓN

Se ha demostrado que la nefrotoxicidad inducida por CsA se debe, al menos en parte, a la producción de ROS^{10,11,14,16}. Los mecanismos moleculares por los que la CsA produce ROS no son bien conocidos, pero se ha considerado que su formación podría favorecerse por la acción del fármaco sobre sistemas como el citocromo P450, NADPH oxidasa o xantina oxidasa o bien como consecuencia de la disminución de los sistemas antioxidantes intracelulares²⁴. Como una de las fuentes fisiológicas principales de ROS son las mitocondrias, nuestro estudio se planteó con el fin de definir el posible papel de la mitocondria en la nefrotoxicidad inducida por CsA. De

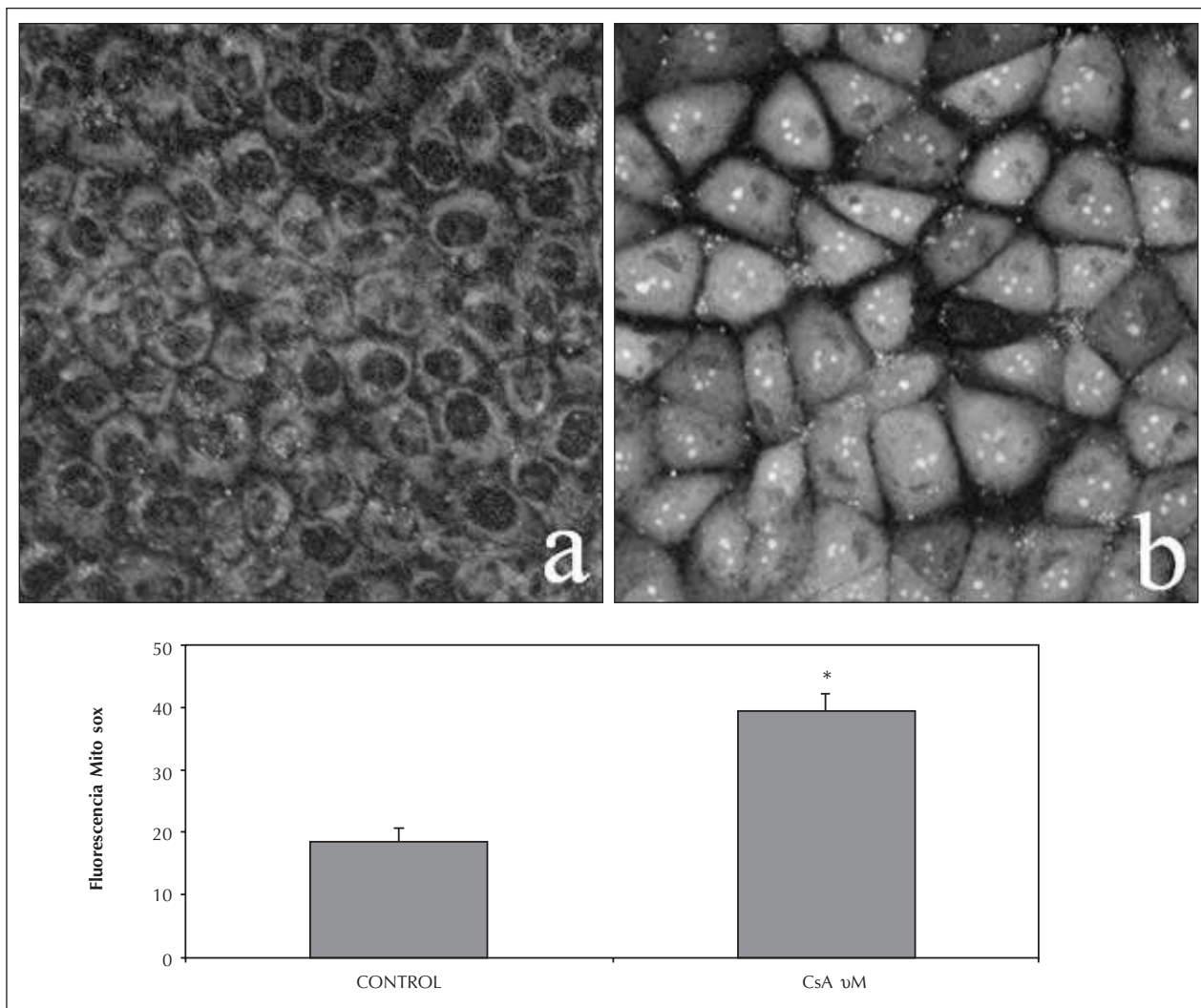


Fig. 2.—Producción de anión superóxido mitocondrial. Las células tratadas con CsA 1 μ M (b) mostraron una mayor fluorescencia (2,1 veces) que las control (a) ($p < 0,05$), como se observa en las imágenes de microscopía confocal (panel superior) y diagrama de barras (panel inferior).

hecho, en condiciones normales, se estima que el 1-2% del oxígeno de la cadena respiratoria se convierte en $O_2^{\cdot-}$ ²⁵. Las mitocondrias disponen, no obstante, de un complejo sistema de antioxidantes capaces de detoxificar estos ROS²⁵. Entre ellos se encuentran enzimas (como la superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, catalasa, glutatión reductasa o glutatión NADP transhidrogenasa) y otras moléculas de menor tamaño (como glutatión, NAD(P)H, vitaminas E y C) que combinadas constituyen un eficaz sistema antioxidante²⁶. La acción de estos componentes está integrada de forma que el $O_2^{\cdot-}$ liberado en la cadena respiratoria es metabolizado por la superóxido dismutasa

mitocondrial (SOD-Mn) a peróxido de hidrógeno y éste a su vez es detoxificado por la glutatión peroxidasa intra y/o extramitocondrial²⁷⁻²⁹. La glutatión peroxidasa se mantiene reducida gracias al glutatión, que a su vez es reducido por la NADH y NAD(P)H por la NADP-transhidrogenasa²⁷.

Hemos demostrado que la CsA produce un aumento de la producción mitocondrial de $O_2^{\cdot-}$ y que este aumento es paralelo al descenso de NADPH, molécula fundamental en el mantenimiento del estado reducido del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial y cuyo descenso está relacionado con diferentes modelos de muerte celular^{30,31}. Experi-

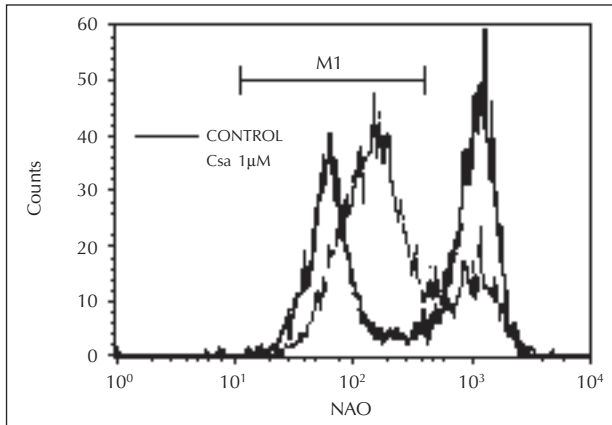


Fig. 3.—Análisis del contenido de cardiolipina mitocondrial. La CsA disminuye la fluorescencia verde de NAO respecto a las células control 1,7 veces ($p < 0,05$) y aumenta el porcentaje de células con alto contenido en cardiolipina oxidada (M1).

mentos realizados en mitocondrias aisladas, han sugerido que el descenso de NADPH podría ser secundario a la oxidación de enzimas involucrados en su síntesis como la deshidrogenasa o citrato sintasa mitocondriales³². El aumento de O_2^- también ha sido descrito por otros autores en células tubulares y endoteliales^{24,33,34}. Aunque los mecanismos íntimos por los que se produce este efecto no son bien conocidos, se ha sugerido que podría activar el enzima NADPH oxidasa³³.

También demostramos que la CsA aumentó los ROS intracelulares del mismo modo que han evidenciado

otros autores^{24,35,36}. Además, produjo una reducción del contenido celular de tioles reducidos, fenómeno que puede ser determinante en el metabolismo celular, ya que muchas proteínas contienen grupos tioles y que su oxidación, con formación de puentes disulfuro, puede provocar alteraciones de su estructura tridimensional y funcionalidad³⁷. Por otro lado, el GSH mantiene reducida en condiciones normales la enzima glutatión-peroxidasa^{27,29} y este hecho contribuye a disminuir la capacidad antioxidante celular.

Las consecuencias del aumento de O_2^- pueden ser muy nocivas para la célula, ya que es altamente reactivo y puede oxidar con mucha facilidad moléculas adyacentes²⁵. La CL es el principal lípido constituyente de la membrana interna mitocondrial y contribuye a la estabilización de la misma a través de sus interacciones con las proteínas y los complejos de la cadena respiratoria³⁸⁻⁴⁰. Su alto contenido en ácidos grasos insaturados y su proximidad a los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial la hacen particularmente susceptible al daño oxidativo por ROS⁴¹⁻⁴⁴. Nuestros experimentos han demostrado que la CsA alteró la emisión de fluorescencia de NAO, sustrato que se une de forma específica a la CL, sugiriendo la oxidación de la misma. También observamos un aumento del porcentaje de células con alto contenido de cardiolipina oxidada. Este hecho puede tener consecuencias trascendentales sobre la fisiología y estructura mitocondriales. Uno de los efectos más precoces deriva de que la CL oxidada se une con menos afinidad al citocromo c, propiciando la liberación del mismo al espacio intermembrana mitocondrial⁴⁵. Por

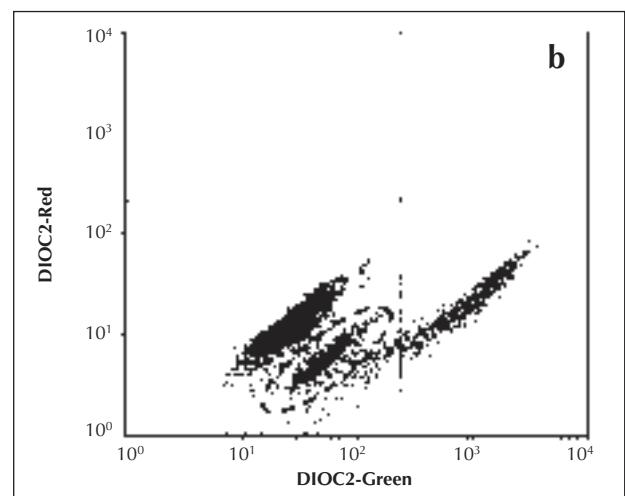
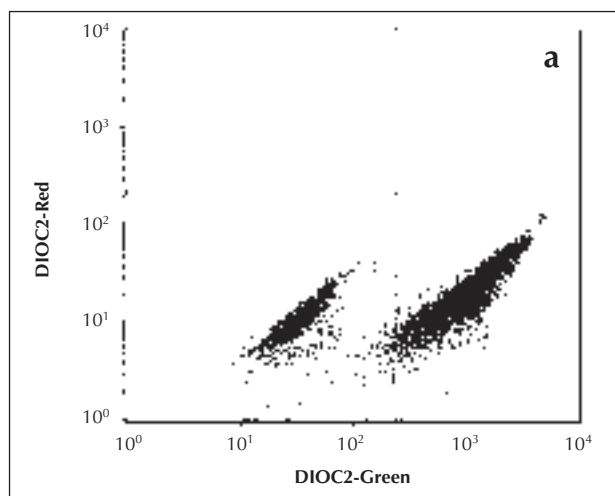


Fig. 4.—Evaluación del potencial de membrana mitocondrial. Tras marcaje con $DIOC_2^3$, las células tratadas con CsA (b) experimentaron una disminución de 2,2 veces del valor medio de fluorescencia a 530 nm (green) respecto a las controles (a) ($p < 0,05$). Se marca con línea discontinua una subpoblación con fluorescencia a 530 nm intermedia y fluorescencia a 575 nm (red) disminuida (células con mayor tendencia a despolarizarse).

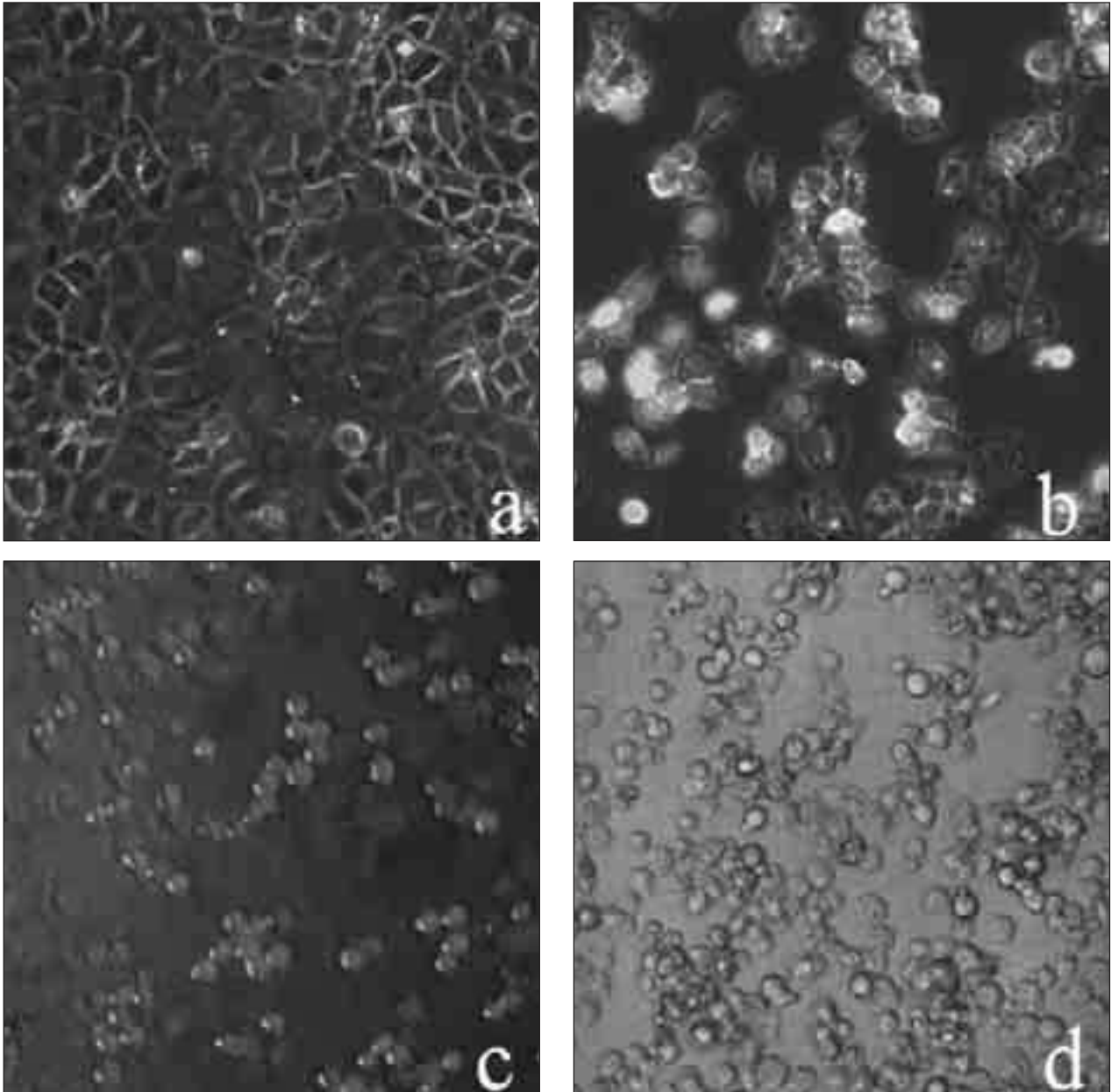


Fig. 5.—Radicales libres intracelulares. En el panel superior se observa que la CsA (b) provocó un aumento de la fluorescencia emitida por DCFH-DA respecto a las células control (a). En el panel inferior se muestra que la tinción con monobromobimano (mBrB) reveló un mayor contenido en tioles reducidos en células control (a) respecto a células tratadas con CsA (b).

otro lado, la oxidación de la CL afecta a varios complejos de la cadena respiratoria mitocondrial, alterando el flujo electrónico a través de ellos²⁰. Como existe un mecanismo acoplado al transporte de electrones, que consiste en la traslocación de protones desde la matriz mitocondrial al espacio intermembrana, tampoco se generará el gradiente electroquímico impres-

cindible para la síntesis de ATP mitocondrial, comprometiéndose también el metabolismo energético celular¹⁹.

Nuestros resultados, utilizando DIOC_2^3 corroboran esta hipótesis y demuestran que la CsA produjo un descenso del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) y un aumento del porcentaje de células des-

polarizadas. Hallazgos similares han sido descritos por otros autores en diferentes modelos celulares^{24,36}. Así, en monocitos humanos se ha demostrado que la CsA provoca despolarización de la membrana mitocondrial y aumenta el porcentaje de células despolarizadas a lo largo del tiempo, de un modo paralelo al aumento de síntesis de ROS³⁶. La CsA también provocó un aumento de la liberación del citocromo c mitocondrial al citosol, sugiriendo que produce una apertura de los denominados poros de transición de permeabilidad mitocondrial (PTPM)³⁶. Éstos son estructuras no totalmente definidas que parecen formarse en lugares de contacto de las membranas mitocondriales externa e interna^{37,46-48}. Se ha descrito que su apertura puede condicionar la liberación de factores proapoptóticos mitocondriales como el citocromo c^{37,45,48}. Así, se ha demostrado que paralelamente a inducir despolarización de la membrana mitocondrial, la CsA aumentó la actividad de la caspasa 3 y aparecieron marcadores sugestivos de apoptosis celular (positividad para anexina y fragmentación de DNA)^{24,36}. La apertura de los poros además, originaría un desacoplamiento de la cadena respiratoria y la interrupción de la transferencia de electrones por la liberación del citocromo c con un aumento añadido de la producción de O₂⁻⁴⁹. Con dosis más elevadas, la CsA puede originar incluso disrupción de la membrana plasmática, liberación de LDH y, en última instancia, necrosis celular^{36,50}.

Estudios previos han demostrado que la CsA provoca apoptosis celular, aunque los mecanismos íntimos no se conocen completamente⁵¹. Una hipótesis plausible es que el daño mitocondrial provocado por la CsA, con apertura de PTPM, despolarización mitocondrial, oxidación de cardiolipina y eventual liberación de citocromo c al citoplasma tiene un papel relevante en el desencadenamiento de la apoptosis⁴⁵.

En definitiva, nuestros resultados sugieren que la CsA provoca un aumento de ROS en la mitocondria y que a su vez, la mitocondria se ve afectada por este aumento, originándose oxidación de la cardiolipina de la membrana interna y alteración del potencial de membrana, fenómenos que pueden tener consecuencias sobre la estructura (formación de PTPM y liberación de citocromo c) y función mitocondrial (afectación de la cadena respiratoria y síntesis de ATP)⁵². El daño mitocondrial puede a su vez condicionar la puesta en marcha de eventos que conducen a apoptosis o necrosis celular.

Aunque todavía no se ha demostrado claramente en humanos que la nefrotoxicidad por CsA u otros fármacos pueda revertirse con antioxidantes exógenos, nuestros experimentos abren nuevas vías de conocimiento que pueden ayudar a conocer mejor el papel de los ROS en la toxicidad celular renal.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio ha sido posible gracias a una ayuda de la Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha (04065-00). J Pérez de Hornedo, M Calvino Fernández y S Benito Martínez han disfrutado de becas de la Fundación Francisco Cobos, la Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha (03017-00) y Schering Plough, respectivamente.

BIBLIOGRAFÍA

1. Calne RY, White DJ, Thiru S, Evans DB, McMaster P, Dunn DC, y cols.: Cyclosporin A in patients receiving renal allografts from cadaver donors. *Lancet* 2 (8104-5): 1323-7, 1978.
2. Kahan BD: Cyclosporine. *N Engl J Med* 321 (25): 1725-38, 1989.
3. Shihab FS: Cyclosporine nephropathy: pathophysiology and clinical impact. *Semin Nephrol* 16 (6): 536-47, 1996.
4. Barros EJ, Boim MA, Ajzen H, Ramos OL, Schor N: Glomerular hemodynamics and hormonal participation on cyclosporine nephrotoxicity. *Kidney Int* 32 (1): 19-25, 1987.
5. Berty RM, Adler S: *In vivo* and *in vitro* rat model for cyclosporine-induced proximal tubular toxicity. *J Lab Clin Med* 118 (1): 17-25, 1991.
6. Mihatsch MJ, Thiel G, Ryffel B: Histopathology of cyclosporine nephrotoxicity. *Transplant Proc* 20 (Supl. 3): 759-71, 1988.
7. Coffman TM, Carr DR, Yarger WE, Klotman PE: Evidence that renal prostaglandin and thromboxane production is stimulated in chronic cyclosporine nephrotoxicity. *Transplantation* 43 (2): 282-5, 1987.
8. Dos Santos OF, Boim MA, Barros EJ, Pirozky E, Braquet P, Schor N: Nephrotoxicity of cyclosporine: the role of platelet-activating factor and thromboxane. *Lipids* 26 (12): 1320-3, 1991.
9. Perico N, Zoja C, Benigni A, Ghilardi F, Gualandris L, Remuzzi G. Effect of short-term cyclosporine administration in rats on renin-angiotensin and thromboxane A2: possible relevance to the reduction in glomerular filtration rate. *J Pharmacol Exp Ther* 239 (1): 229-35, 1986.
10. Parra T, De Arriba G, Arribas I, Pérez de Lema G, Rodríguez-Puyol D, Rodríguez-Puyol M: Cyclosporine A nephrotoxicity: role of thromboxane and reactive oxygen species. *J Lab Clin Med* 131 (1): 63-70, 1998.
11. Parra T, De Arriba G, Conejo JR, Cantero M, Arribas I, Rodríguez-Puyol D y cols.: Cyclosporine increases local glomerular synthesis of reactive oxygen species in rats: effect of vitamin E on cyclosporine nephrotoxicity. *Transplantation* 66 (10): 1325-9, 1998.
12. Pérez de Lema G, Arribas I, Prieto A, Parra T, De Arriba G, Rodríguez-Puyol D y cols.: Cyclosporin A-induced hydrogen peroxide synthesis by cultured human mesangial cells is blocked by exogenous antioxidants. *Life Sci* 62 (19): 1745-53, 1998.
13. Pérez de Lema G, Arribas-Gómez I, Ruiz-Gines JA, De Arriba G, Prieto A, Rodríguez-Puyol D y cols.: Reactive oxygen species mediate the effects of cyclosporine A on human cultured mesangial cells. *Transplant Proc* 29 (1-2): 1241-3, 1997.
14. Wang C, Salahudeen AK: Cyclosporine nephrotoxicity: attenuation by an antioxidant-inhibitor of lipid peroxidation *in vitro* and *in vivo*. *Transplantation* 58 (8): 940-6, 1994.
15. Padi SS, Chopra K: Salvage of cyclosporine A-induced oxidative stress and renal dysfunction by carvedilol. *Nephron* 92 (3): 685-92, 2002.

16. Parra Cid T, Conejo García JR, Carballo Álvarez F, De Arriba G: Antioxidant nutrients protect against cyclosporine A nephrotoxicity. *Toxicology* 189 (1-2): 99-111, 2003.
17. Gendron MC, Schrantz N, Metivier D, Kroemer G, Maciorowska Z, Sureau F y cols.: Oxidation of pyridine nucleotides during Fas- and ceramide-induced apoptosis in Jurkat cells: correlation with changes in mitochondria, glutathione depletion, intracellular acidification and caspase 3 activation. *Biochem J* 353 (Pt 2): 357-67, 2001.
18. Kudin AP, Bimpong-Buta NY, Vielhaber S, Elger CE, Kunz WS: Characterization of superoxide-producing sites in isolated brain mitochondria. *J Biol Chem* 279 (6): 4127-35, 2004.
19. Haines TH, Dencher NA. Cardiolipin: a proton trap for oxidative phosphorylation. *FEBS Lett* 528 (1-3): 35-9, 2002.
20. Paradies G, Petrosillo G, Pistolesse M, Ruggiero FM: Reactive oxygen species affect mitochondrial electron transport complex I activity through oxidative cardiolipin damage. *Gene* 286 (1): 135-41, 2002.
21. Poot M, Pierce RH: Detection of changes in mitochondrial function during apoptosis by simultaneous staining with multiple fluorescent dyes and correlated multiparameter flow cytometry. *Cytometry* 35 (4): 311-7, 1999.
22. Bass DA, Parce JW, Dechatelet LR, Szejda P, Seeds MC, Thomas M: Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation. *J Immunol* 130 (4): 1910-7, 1983.
23. Shrieve DC, Bump EA, Rice GC: Heterogeneity of cellular glutathione among cells derived from a murine fibrosarcoma or a human renal cell carcinoma detected by flow cytometric analysis. *J Biol Chem* 263 (28): 14107-14, 1988.
24. Jeon SH, Piao YJ, Choi KJ, Hong F, Baek HW, Kang I y cols.: Prednisolone suppresses cyclosporin A-induced apoptosis but not cell cycle arrest in MDCK cells. *Arch Biochem Biophys* 435 (2): 382-92, 2005.
25. Kowaltowski AJ, Vercesi AE. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 26 (3-4): 463-71, 1999.
26. Turrens JF: Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Biosci Rep* 17 (1): 3-8, 1997.
27. Chance B, Sies H, Boveris A: Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 59 (3): 527-605, 1979.
28. Fridovich I. Superoxide anion radical (O₂⁻), superoxide dismutases, and related matters. *J Biol Chem* 272 (30): 18515-7, 1997.
29. Radi R, Turrens JF, Chang LY, Bush KM, Crapo JD, Freeman BA: Detection of catalase in rat heart mitochondria. *J Biol Chem* 266 (32): 22028-34, 1991.
30. Nieminen AL, Byrne AM, Herman B, Lemasters JJ: Mitochondrial permeability transition in hepatocytes induced by t-BuOOH: NAD(P)H and reactive oxygen species. *Am J Physiol* 272 (4 Pt 1): C1286-94, 1997.
31. Shiino A, Matsuda M, Handa J, Chance B: Poor recovery of mitochondrial redox state in CA1 after transient forebrain ischemia in gerbils. *Stroke* 29 (11): 2421-4, 1998; discussion 2425.
32. Galindo MF, Jordan J, González-García C, Cena V: Reactive oxygen species induce swelling and cytochrome c release but not transmembrane depolarization in isolated rat brain mitochondria. *Br J Pharmacol* 139 (4): 797-804, 2003.
33. Vetter M, Chen ZJ, Chang GD, Che D, Liu S, Chang CH: Cyclosporin A disrupts bradykinin signaling through superoxide. *Hypertension* 41 (5): 1136-42, 2003.
34. Raymond MA, Mollica L, Vigneault N, Desormeaux A, Chan JS, Filep JG y cols.: Blockade of the apoptotic machinery by cyclosporin A redirects cell death toward necrosis in arterial endothelial cells: regulation by reactive oxygen species and cathepsin D. *Faseb J* 17 (3): 515-7, 2003.
35. Navarro-Antolín J, López-Muñoz MJ, Klatt P, Soria J, Michel T, Lamas S: Formation of peroxyxynitrite in vascular endothelial cells exposed to cyclosporine A. *Faseb J* 15 (7): 1291-3, 2001.
36. Roy MK, Takenaka M, Kobori M, Nakahara K, Isobe S, Tsushida T: Apoptosis, necrosis and cell proliferation-inhibition by cyclosporine A in U937 cells (a human monocytic cell line). *Pharmacol Res* 53 (3): 293-302, 2006.
37. Kowaltowski AJ, Castilho RF, Vercesi AE: Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. *FEBS Lett* 495 (1-2): 12-5, 2001.
38. Gómez B Jr, Robinson NC: Phospholipase digestion of bound cardiolipin reversibly inactivates bovine cytochrome bc1. *Biochemistry* 38 (28): 9031-8, 1999.
39. Hayer-Hartl M, Schagger H, Von Jagow G, Beyer K: Interactions of phospholipids with the mitochondrial cytochrome-c reductase studied by spin-label ESR and NMR spectroscopy. *Eur J Biochem* 209 (1): 423-30, 1992.
40. Schagger H: Respiratory chain supercomplexes of mitochondria and bacteria. *Biochim Biophys Acta* 1555 (1-3): 154-9, 2002.
41. Daum G: Lipids of mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 822 (1): 1-42, 1985.
42. Hovius R, Thijssen J, Van der Linden P, Nicolay K, De Kruijff B: Phospholipid asymmetry of the outer membrane of rat liver mitochondria. Evidence for the presence of cardiolipin on the outside of the outer membrane. *FEBS Lett* 330 (1): 71-6, 1993.
43. Ioannou PV, Golding BT: Cardiolipins: their chemistry and biochemistry. *Prog Lipid Res* 17 (3): 279-318, 1979.
44. Liu J, Dai Q, Chen J, Durrant D, Freeman A, Liu T y cols.: Phospholipid scramblase 3 controls mitochondrial structure, function, and apoptotic response. *Mol Cancer Res* 1 (12): 892-902, 2003.
45. Kagan VE, Borisenko GG, Tyurina YY, Tyurin VA, Jiang J, Potapovich AI y cols.: Oxidative lipidomics of apoptosis: redox catalytic interactions of cytochrome c with cardiolipin and phosphatidylserine. *Free Radic Biol Med* 37 (12): 1963-85, 2004.
46. Montero M, Lobatón CD, Gutiérrez-Fernández S, Moreno A, Álvarez J: Calcineurin-independent inhibition of mitochondrial Ca²⁺ uptake by cyclosporin A. *Br J Pharmacol* 141 (2): 263-8, 2004.
47. Halestrap AP, Brennerb C: The adenine nucleotide translocase: a central component of the mitochondrial permeability transition pore and key player in cell death. *Curr Med Chem* 10 (16): 1507-25, 2003.
48. Kim JS, He L, Lemasters JJ: Mitochondrial permeability transition: a common pathway to necrosis and apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 304 (3): 463-70, 2003.
49. Cai J, Jones DP. Superoxide in apoptosis. Mitochondrial generation triggered by cytochrome c loss. *J Biol Chem* 273 (19): 11401-4, 1998.
50. Lally C, Healy E, Ryan MP: Cyclosporine A-induced cell cycle arrest and cell death in renal epithelial cells. *Kidney Int* 56 (4): 1254-7, 1999.
51. Ortiz A, Lorz C, Catalán M, Ortiz A, Coca S, Egido J: Cyclosporine A induces apoptosis in murine tubular epithelial cells: role of caspases. *Kidney Int Suppl* 54: S25-9, 1998.
52. Chen HW, Chien CT, Yu SL, Lee YT, Chen WJ: Cyclosporine A regulate oxidative stress-induced apoptosis in cardiomyocytes: mechanisms via ROS generation, iNOS and Hsp70. *Br J Pharmacol* 137 (6): 771-81, 2002.