

Original

Efecto citoprotector del tacrolimus a dosis bajas sobre islotes de Langerhans en cultivo sometidos a estímulos por citocinas del rechazo agudo[☆]

José María Balibrea del Castillo^{a,*}, Javier Arias-Díaz^b, María Cruz García Martín^c, Marta Vives-Pi^d, Juan Carlos García Pérez^{e,f}, Ramón Cantero Cid^{e,f}, Elena Vara Ameigeiras^c y José Luis Balibrea Cantero^f

^aServicio de Cirugía General y Digestiva, Hospital Universitario Germans Trias i Pujol, Departamento de Cirugía, Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona, España

^bDepartamento de Cirugía, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España

^cDepartamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España

^dLaboratorio de Inmunobiología para la Investigación y Diagnóstico (LIRAD), Fundación Instituto de Investigación en Ciencias de la Salud Germans Trias i Pujol, Badalona, Barcelona, España

^eHospital Infanta Sofía, San Sebastián de los Reyes, Madrid, España

^fGrupo Investigaciones Quirúrgicas Básicas y Clínicas, Departamento de Cirugía, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 9 de noviembre de 2009

Aceptado el 12 de marzo de 2010

On-line el 10 de mayo de 2010

Palabras clave:

Trasplante de islotes pancreáticos

Apoptosis

Estrés oxidativo

Tacrolimus

Inmunosupresión

RESUMEN

Introducción: La mejoría de los resultados en el trasplante de islotes pancreáticos se debe en gran parte a la introducción de nuevos protocolos de inmunosupresión que incluyen, entre otros, tacrolimus a bajas dosis. Este fármaco tiene efectos antioxidantes y antiapoptóticos que podrían ser de utilidad en la prevención del rechazo primario.

Objetivos: Evaluar la respuesta *in vitro* a tacrolimus a bajas dosis en islotes de rata estimulados con citocinas proinflamatorias implicadas en el rechazo primario de islotes.

Material y método: Se cultivaron islotes de rata en medio RPMI determinándose producción de lipoperóxido (LPO) y óxido nítrico (NO) y marcadores de apoptosis (nucleosomas y Bcl-2) en presencia de IL-1 (50 UI/ml) e IF- γ (1000 UI/ml) y adición de tacrolimus (FK-506; 5 ng/ml). **Resultados:** Tras la estimulación se apreció un aumento muy significativo ($p < 0,01$) de los marcadores de estrés oxidativo (LPO $10,1 \pm 1,16$ pmol/islote x 24; NO $19,1 \pm 3,28$ pmol/islote x 24 h) y apoptosis (nucleosomas $0,24 \pm 0,04$; Bcl-2 $0,69 \pm 0,212$). Dichos efectos fueron contrarrestados de manera significativa tras añadir tacrolimus, siendo la reversión completa (p NS frente a controles) en el caso de la producción de lipoperóxidos (1,58 pmol/islote x 24 h) y óxido nítrico (9,81 pmol/islote x 24 h) así como en el descenso de Bcl-2 ($1,37 \pm 0,23$ Ui/islote).

Conclusiones: El efecto citoprotector *in vitro* del tacrolimus a bajas dosis sobre islotes estimulados con citocinas proinflamatorias consigue aminorar la generación de estrés

[☆] Comunicaciones previas: Resultados preliminares presentados en la IX Reunión Nacional de Residentes de Médicos Residentes de Cirugía, Madrid, 2005.

*Autor para correspondencia.

Correo electrónico: balibrea@gmail.com (J.M. Balibrea del Castillo).

oxidativo y la activación de la apoptosis, habitualmente implicados en el rechazo en las primeras 48h postimplante.

© 2009 AEC. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Cytoprotective effect of low-dose tacrolimus on islets of Langerhans in cultures subjected to stimulation by acute rejection cytokines

A B S T R A C T

Keywords:

Pancreatic islet transplantation
Apoptosis
Oxidative stress
Tacrolimus
Immunosuppression

Introduction: The improvement in pancreatic islet transplantation results is due to immunosuppression protocols that include, among others, low-dose tacrolimus. Both anti-inflammatory and anti-oxidant effects of tacrolimus could be useful in preventing primary rejection.

Aim: To evaluate in vitro islet low-dose tacrolimus response after pro-inflammatory stimulation.

Material and methods: Isolated rat islets were cultured in RPMI medium in the presence of IL-1 (50 UI/mL) plus IF- γ (1000 UI/mL) and tacrolimus (5 ng/mL). The 24h production of lipoperoxide (LPO) and nitric oxide (NO) were measured as oxidative stress markers. Determination of apoptosis markers (nucleosome content and Bcl-2) was also performed.

Results: Oxidative stress (LPO 10.1 ± 1.16 pmol/islet x 24; NO 19.1 ± 3.28 pmol/islet x 24h) and apoptosis (nucleosome 0.24 ± 0.04 UI/islet; Bcl-2 0.69 ± 0.212 UI/islet) markers showed a very significant increase after cytokine stimulation ($p < 0.01$). Both effects improved by adding tacrolimus to the medium. Protective effect was complete when lipoperoxide (1.58 pmol/islet x 24h), nitric oxide (9.81 pmol/islet x 24h) and Bcl-2 (1.37 ± 0.23 UI/islet) were determined.

Conclusion: In vitro cytoprotective effect of low-dose tacrolimus on isolated rat islets decreases both oxidative stress and apoptosis markers after stimulation of pro-inflammatory mediators.

© 2009 AEC. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

Actualmente el trasplante de islotes pancreáticos (TIP) es una alternativa válida de cara al tratamiento de la diabetes tipo 1. La mejoría en sus resultados en cuanto a insulnoindependencia y mejor control metabólico se deben en gran parte a las mejorías introducidas en la selección de donantes y receptores, aislamiento, preservación e inmunosupresión¹. Junto con la escasez de donantes, los problemas inmunológicos siguen siendo el principal obstáculo para la generalización del trasplante de islotes². En ese sentido, la persistencia de la autoinmunidad y el rechazo son los principales aspectos a tener en cuenta³. Sin embargo, la supervivencia de los islotes trasplantados se ve amenazada además por una serie de fenómenos que generan una respuesta inflamatoria inespecífica. Además la presencia de la respuesta inmunitaria innata origina la pérdida de una parte importante de los islotes durante las primeras 48h postimplante de modo que este fracasa sin que la mayoría de los islotes hayan llegado a funcionar en algún momento⁴. Este fenómeno es conocido como rechazo/disfunción primario. Dicho fenómeno se observa también en trasplantes singénicos y autotrasplante sin que se observe la participación de la inmunidad adaptativa⁵ y sí una liberación masiva de mediadores proinflamatorios como TNF- α , IL-1 o IL-6⁶. La activación de señales proapoptóticas y generación de estrés oxidativo está desencadenada tanto por macrófagos intraislote como células ductales, endoteliales e incluso las propias células beta^{4,7}. Por otra parte, el estrés mecánico, químico e isquémico originado durante la obtención y el aislamiento de los islotes

contribuye notablemente a la pérdida de islotes⁴. Asimismo, la introducción de tratamientos capaces de disminuir los fenómenos proinflamatorios y proapoptóticos observados en el rechazo primario tras TIP han mejorado tanto la viabilidad como la supervivencia de los islotes trasplantados⁸.

La mayoría de los protocolos actualmente empleados en el TIP incluyen tacrolimus a bajas dosis⁹. Independientemente de sus efectos negativos sobre las células beta a largo plazo, en determinadas circunstancias posee un efecto citoprotector actuando tanto como antiinflamatorio inespecífico como bloqueador de fenómenos apoptóticos^{10,11}. Así, tales acciones podrían ser de utilidad TIP al aminorar o contrarrestar los fenómenos fisiopatológicos asociados al rechazo primario¹².

El objetivo de nuestro trabajo fue evaluar el posible efecto citoprotector del tacrolimus a bajas dosis en islotes de rata sometidos a estímulos similares a los que participan en el rechazo primario tras su trasplante.

Material y métodos

Se emplearon ratas Wistar macho de 250-350 gramos conservadas en régimen de estabulación convencional, alimentadas con pienso estándar (Panlab; Barcelona) sometidas a ciclos automáticos de luz/oscuridad de 12h y una temperatura de 22 ± 2 °C.

Todos los experimentos se realizaron observando la Ley 32/2007 para el cuidado de los animales, en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio, en cumplimiento

con las normativas para el bienestar animal vigentes en la Unión Europea.

Aislamiento de islotes

Los islotes fueron obtenidos tras disección y canulación selectiva del ducto pancreático en las ratas utilizando un catéter Abbocath de 16Fr. Posteriormente y previo clampaje duodenal proximal y distal, se infundió una disolución de colagenasa P 2 mg/ml (1213865; Roche Diagnostics; Laval, Canadá) hasta conseguir una distensión completa de la cápsula pancreática. Posteriormente se llevó a cabo el proceso de digestión enzimática en cámara cerrada a 37 °C (Bio-Rep; Miami, EE.UU.), que se detuvo mediante adición de solución de Hank a 4 °C (PAA Laboratories GmbH; Linz, Austria) durante 4 ciclos consecutivos hasta obtener al menos 100.000 equivalentes de islote (EI). Posteriormente se añade al medio una disolución de ditizona 20 mg/ml (Sigma-Aldrich; St.Louis, EE.UU.) para conseguir una visualización por tinción a rojo de los islotes, comprobándose su viabilidad cada 2 min. A continuación se realizó un gradiente de Ficoll (Sigma Chemical Co; St. Louis, EE.UU.) mediante un procesador celular COBE (Denver, EE.UU.). El remanente de islotes se recogió manualmente bajo visión directa hasta almacenar a los islotes en grupos de 300 EI.

Cultivo de islotes y adición de estímulos proinflamatorios

Durante 24 h los islotes fueron cultivados en medio RPMI-1640 (PAA Laboratories GmbH; Linz, Austria) a 37 °C en una microatmósfera de 95%O₂/5% CO₂. Se añadieron al medio tanto glucosa 11,11 mm como albúmina sérica bovina (Sigma Chemical Co; St. Louis, EE.UU.) (0,1%). Los islotes pancreáticos fueron estimulados añadiendo al medio de cultivo 50 IU/ml de interleucina-1 (IL-1), (Boehringer Mannheim GmbH; Germany) y 1000 IU/ml de interferón-gamma (γ -IF), (Boehringer Mannheim GmbH; Germany). Como tratamiento, se empleó tacrolimus (FK-506) a bajas dosis (5 ng/ml) (Fujisawa; Osaka, Japan) en el mismo medio de cultivo.

Grupos experimentales

Se realizaron experimentos en grupos de 5 ratas diferentes obteniéndose de cada una de ellas muestras de 300 EI recogidos manualmente bajo visión microscópica. Los grupos experimentales fueron: controles, islotes únicamente tratados, islotes únicamente estimulados e islotes estimulados y tratados.

Determinaciones

Las muestras de 300 EI fueron homogeneizadas mediante centrifugación secuencial (600 g x2; 5.500 x2; 2.400 g; 10.000 g) separándose material citosólico y microsomal por separado. Con el objetivo de evaluar la aparición de fenómenos apoptóticos, se determinaron los valores de nucleosomas (contenido intraislote; UI/islote) y proteína Bcl-2 (UI/islote) mediante kits comerciales para ELISA/ espectrofotometría (Calbiochem ; La Jolla, USA & Canadá). De cara a evaluar la repercusión sobre la generación de estrés oxidativo de novo, se determinaron los valores de óxido nítrico (NO) y lipoperoxidos (LPO). La determinación de NO (fmol/ ml x 24h) se

realizó mediante la reacción de Griess (absorbancia a 550 nm). La medición de niveles de LPO (fmol/islote) se llevó a cabo mediante kits espectrofotométricos *ad hoc* (absorbancia a 533 nm; Calbiochem; La Jolla, EE.UU y Canadá).

Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados se llevó a cabo mediante el paquete informático Statgraphics Plus 5.1 package (Statpoint Inc., EE.UU.) para Microsoft Windows NT. La comparación de las medias de los grupos se llevó a cabo mediante el análisis factorial de la varianza (ANOVA) y test de Scheffé's *post-hoc*. Los resultados se expresan como medias \pm ESM. Se consideraron como significativos valores de $p < 0,05$ y muy significativos $< 0,01$.

Resultados

La adición de tacrolimus a bajas dosis al medio de cultivo de islotes de rata estimulados con IL-1 e IF- γ consiguió aminorar de modo significativo el aumento de marcadores de daño celular observados tras la exposición a citocinas.

A. Generación de estrés oxidativo

La estimulación con IL-1/IF- γ se correlacionó con un aumento muy significativo ($p < 0,01$) de las concentraciones de marcadores de estrés oxidativo (LPO y NO). En ambos experimentos, la adición de tacrolimus revirtió completamente tal efecto de tal manera que los valores de dichos marcadores disminuyeron hasta ser equiparables a los de los controles. No hubo variaciones significativas en la concentración de LPO o NO en islotes tratados únicamente con fármaco (figs. 1 y 2).

B. Activación de la apoptosis

La estimulación con mediadores proinflamatorios se tradujo en un aumento de los marcadores de apoptosis, de tal manera que aumentó muy significativamente las presencia de nucleosomas y disminuyó la concentración de Bcl-2 ($p < 0,01$). En ambos casos la adición de tacrolimus al medio de cultivo aminoró tal efecto. En el caso de los nucleosomas la disminución fue muy significativa frente al grupo de islotes estimulados ($p < 0,01$) pero no alcanzó niveles equiparables a los de los controles ($p < 0,05$). Cuando se determinaron los niveles de Bcl-2, el fármaco revirtió completamente el descenso observado tras la adición de citocinas proinflamatorias de tal manera que los valores fueron equiparables a los de los controles. Al igual que en el caso de los marcadores de estrés oxidativo, no hubo variaciones significativas en los niveles de nucleosomas ni Bcl-2 en islotes tratados únicamente con fármaco (figs. 3 y 4).

Discusión

El TIP es una alternativa terapéutica válida en algunos casos de DM1¹. Dentro de los diferentes eventos adversos que han dificultado resultados clínicos favorables de modo habitual, el rechazo primario sigue constituyendo una fuente de disfunción y pérdida de islotes muy importante¹³. Este hecho hace que sean necesarias nuevas estrategias de cara a su

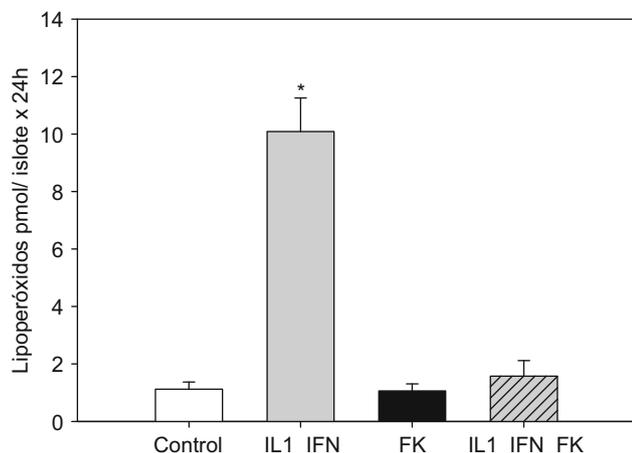


Figura 1 - El incremento de la producción de lipoperóxido en islotes expuestos a citocinas proinflamatorias es contrarrestado por la adición de tacrolimus a bajas dosis. El gráfico muestra la producción de lipoperóxido (media+ESM; pmol/islote x 24h) en islotes de rata cultivados en medio RPMI y estimulados con IL-1 (50 UI/ml) e IF- γ (1000 UI/ml) en presencia de tacrolimus a bajas dosis (5 ng/ml). La adición de citocinas induce un aumento muy significativo en la producción de lipoperóxido, hecho que se contrarresta al añadir el fármaco (* $p < 0,01$ frente a todos los grupos restantes).

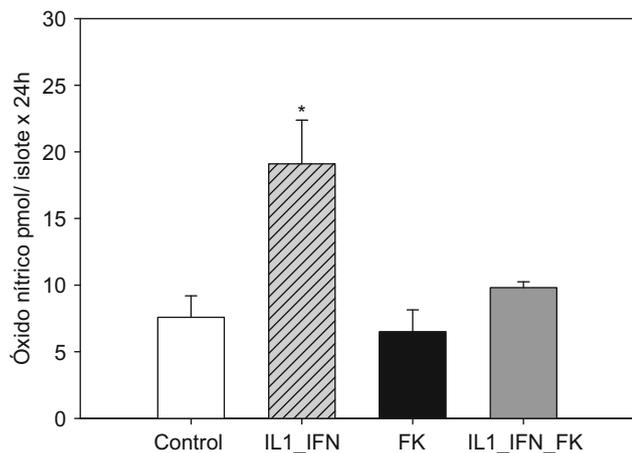


Figura 2 - La estimulación de islotes pancreáticos con L-1+IF induce un incremento en la producción de óxido nítrico que es neutralizada en presencia de tacrolimus a bajas dosis. El gráfico de barras refleja el incremento significativo en la producción de óxido nítrico (media+ESM; pmol/islote x 24h) en islotes de rata cultivados en medio RPMI expuestos a IL-1 (50 UI/ml) e IF- γ (1000 UI/ml). Al añadir tacrolimus (5 ng/ml) al medio, este fenómeno es neutralizado reestabliéndose valores equiparables al grupo control (* $p < 0,01$ frente a todos los grupos restantes).

prevención empleando principalmente agentes citoprotectores capaces de neutralizar los eventos fisopatológicos asociados. La utilización del tacrolimus en el TIP siempre ha suscitado dudas por sus propiedades diabotogénicas y proapoptóticas previamente conocidas. Sin embargo, su inclusión a bajas dosis en la gran mayoría de protocolos de

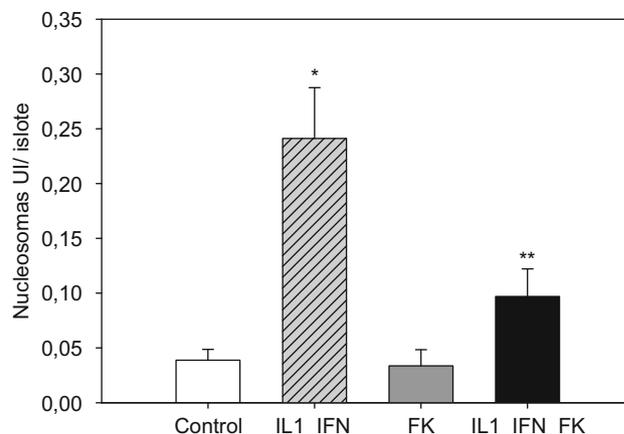


Figura 3 - El incremento de nucleosomas en islotes estimulados con mediadores proinflamatorios es contrarrestado parcialmente por la adición de tacrolimus al medio. En islotes de rata cultivados en medio RPMI la adición de IL-1 (50 UI/ml) e IF- γ (1000 UI/ml) se traduce en un incremento significativo en los niveles de nucleosomas (media+ESM; UI/islote) que disminuye de manera significativa en presencia de tacrolimus a bajas dosis (5 ng/ml). El efecto antiapoptótico del fármaco es parcial ya que los valores no descienden hasta ser equiparables a los del grupo control (* $p < 0,01$ frente a todos los grupos restantes; ** $p < 0,05$ frente a controles).

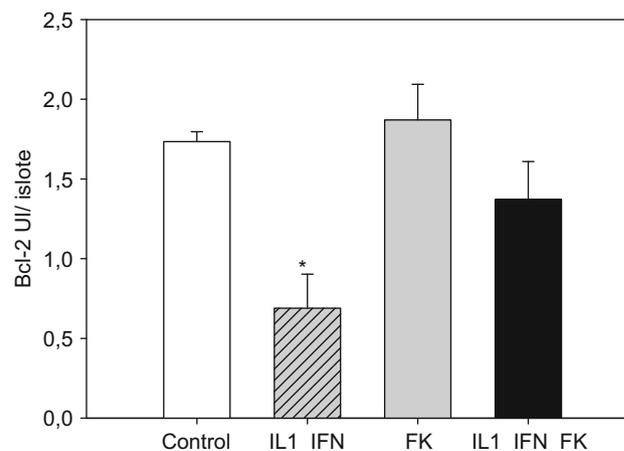


Figura 4 - Tacrolimus revierte el descenso de Bcl-2 en islotes de rata tras la estimulación con de IL-1 e IF- γ . Los niveles de la proteína antiapoptótica Bcl-2 (media+ESM; UI/islote) en islotes de rata cultivados en medio RPMI experimentan un descenso muy significativo en presencia de IL-1 (50 UI/ml) e IF- γ (1.000 UI/ml). Este efecto se ve neutralizado en presencia de tacrolimus a bajas dosis (5 ng/ml) de forma completa (* $p < 0,01$ frente a todos los grupos restantes).

inmunosupresión a partir de la experiencia del grupo de Edmonton en el año 2000¹⁴ sugiere un efecto beneficioso sobre alguno de los tipos de rechazo implicados en el TIP. Sus efectos citoprotectores (antiinflamatorio, antioxidante y antiapoptótico) en diversos modelos experimentales^{15,16} podrían

justificar su efecto beneficioso al interferir en la secuencia de acontecimientos implicados en el rechazo primario.

El presente trabajo muestra un efecto protector *in vitro* del tacrolimus a bajas dosis sobre islotes de rata estimulados con citocinas proinflamatorias habitualmente implicadas en el rechazo primario tras TIP. Tanto la generación de estrés oxidativo como la puesta en marcha de la apoptosis fueron neutralizadas de modo efectivo en presencia del fármaco. En ese sentido, nuestro grupo ha obtenido resultados equiparables empleando islotes humanos estimulados tanto con IL-1 e IF- γ como con otros mediadores inflamatorios como el LPS¹⁷. Estos resultados *in vitro* han de ser interpretados con cautela ya que se trata de islotes murinos y su extrapolación con los efectos sobre el rechazo primario tras TIP real podrían no ser los mismos. Del mismo modo, la valoración *in vivo* del efecto del tacrolimus mediante el trasplante insular permitiría el estudio del efecto global del fármaco en el rechazo tras TIP.

La contribución del estrés oxidativo al desarrollo del rechazo primario tras TIP es un fenómeno bien conocido que tiene como origen muy diversos estímulos que implican al propio proceso de obtención del donante, aislamiento y la respuesta inflamatoria del endotelio del receptor⁴. En el presente trabajo, el tacrolimus ejerció un efecto claramente antioxidante sobre los islotes expuestos a citocinas proinflamatorias. El papel como antioxidante en islotes del tacrolimus es poco conocido, sin embargo ha mostrado efectos beneficiosos en modelos de isquemia reperfusión o daño cerebral^{18,19}. La supervivencia en modelos de isquemia reperfusión en roedores mejora tras el uso de tacrolimus al disminuir la respuesta inflamatoria ya que se frena la producción de especies reactivas de oxígeno, la infiltración por neutrófilos y la producción *in situ* de IL-1 y TNF- α ²⁰. En este caso tanto la producción de NO como de LPO fue neutralizada eficazmente. Estos resultados suponen un bloqueo de fenómenos secundarios a la respuesta inflamatoria tanto precoces como tardíos así como su amplificación. La liberación de NO es un fenómeno de segunda generación que además tiene un potencial efecto mediador, la peroxidación lipídica y la apoptosis se sitúan al final de la secuencia fisiopatológica de la disfunción celular en la respuesta inmune inespecífica. En relación a este hecho, la utilización de agentes bloqueantes de la producción de NO como la NG-Metil-L-arginina (L-NMA) podría contribuir a aminorar el estrés oxidativo asociado al rechazo primario tras TIP.

En nuestros experimentos el tacrolimus consiguió aminorar la respuesta propapótica en condiciones similares a las del rechazo primario. El fármaco revirtió el efecto negativo de la exposición a mediadores de modo significativo pero parcial al valorar los valores de nucleosomas y total en lo que al descenso del factor antiapoptótico Bcl-2 se refiere. La presencia de nucleosomas es un marcador de apoptosis tardío que refleja alteraciones morfológicas. La expresión de la proteína Bcl-2 señala el estado de bloqueo de la cascada apoptótica en la célula. Constitutivamente se expresa en equilibrio con la otra subfamilia proapoptótica (Bax, Bad...)²¹ de tal manera que el descenso de los niveles a consecuencia de los mediadores inflamatorios indica una clara correlación con la pérdida de islotes durante la respuesta inflamatoria inespecífica asociada al rechazo primario del TIP²².

Las alteraciones en las proteínas del grupo Bcl-2 son fenómenos relacionados con la activación de la vía mitocondrial de la apoptosis generalmente en respuesta a la llegada de «señales de muerte celular», es decir, es un fenómeno precoz en la muerte celular programada. De este modo se podría deducir que el tacrolimus actúa preferentemente sobre los fenómenos apoptóticos en los que la vía mitocondrial es la principal ya que el efecto sobre un marcador morfológico tardío (y resultado de la activación de todas las vías apoptóticas) como son los nucleosomas, es parcial. Este efecto diferencial no se ha observado en islotes humanos expuestos a estímulos similares¹⁷. Los efectos del tacrolimus sobre fenómenos apoptóticos son variables y sido poco estudiados en islotes pancreáticos. Son en ocasiones dosis y tejido dependientes, sin que afecte a patrones de apoptosis fisiológicos en modelos animales, pudiendo incluso estimular la regeneración celular^{23,24}. Si bien parte de su acción inmunosupresora se debe a un efecto proapoptótico sobre las células T²⁵, se han descrito efectos antiapoptóticos en presencia de estímulos proinflamatorios¹⁰. Otros autores han comunicado resultados diferentes a los nuestros en islotes humanos no estimulados empleando dosis mucho mayores del fármaco al disminuir los niveles de marcadores antiapoptóticos Bcl-2, Bcl-XL o la transducción del gen XIAP²⁶. El efecto antiapoptótico del tacrolimus podría tener una justificación ultraestructural dado que las proteínas implicadas en su mecanismo de acción (FK-BP) interaccionan con la proteína Bcl-2 reubicándola yuxtamitocondrialmente donde ejerce su efecto antiapoptótico^{27,28}.

Dadas las diversas acciones sobre la apoptosis que el fármaco genera, es posible que tales efectos sean no solo dosis y tejido dependiente sino estímulo dependiente de tal modo que la presencia de la respuesta inmune inmediata favorece el efecto citoprotector y antiapoptótico en células no inmunes si se emplea a dosis bajas.

La prevención del rechazo en el TIP requiere la consideración de fenómenos fisiopatológicos que habitualmente no son tan importantes en otro tipo de trasplantes y frente a los que estrategias de citoprotección son necesarias. En ese sentido el efecto *in vitro* antioxidante y antiapoptótico del tacrolimus a bajas dosis constituye un hallazgo útil que podría tener influencia de cara a diseñar protocolos de inmunosupresión eficaces en el TIP clínico.

Financiación

Estudio financiado a través del Programa de Creación y Consolidación de Grupos de Investigación Universidad Complutense/Comunidad de Madrid; Grupos de Investigación de la Universidad Complutense de Madrid (920210); Grupo «Investigaciones Quirúrgicas Básicas y Clínicas».

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

BIBLIOGRAFÍA

1. Casanova D. Presente y futuro del trasplante de islotes pancreáticos en el tratamiento de la diabetes mellitus. *Cir Esp.* 2009;85:76-83.
2. Harlan DM, Kenyon NS, Korsgren O, Roep BO. Current advances and travails in islet transplantation. *Immunology of Diabetes Society. Diabetes.* 2009;58:2175-84.
3. Hardy MA, Witkowski P, Sondermeijer H, Harris P. The Long Road to Pancreatic Islet Transplantation. *World J Surg.* 2009, doi:10.1007/s00268-009-0246-5.
4. Barshes N, Wyllie S, Goss JA. Inflammation-mediated dysfunction and apoptosis in pancreatic islet transplantation: implications for intrahepatic grafts. *J Leukoc Biol.* 2005;77:587-97.
5. Bottino R, Fernandez LA, Ricordi C, Lehmann R, Tsan MF, Oliver R, et al. Transplantation of allogenic islets of Langerhans in the rat liver: effects of macrophage depletion on graft survival and microenvironment activation. *Diabetes.* 1998;47:316-23.
6. Berney T, Molano RD, Cattan P, Pileggi A, Vizzardelli C, Oliver R, et al. Endotoxin-mediated delayed islet graft function is associated with increased intra-islet cytokine production and islet cell apoptosis. *Transplantation.* 2001;71:125-32.
7. Hanley S, Liu S, Lipsett M, Castellarin M, Rosenberg L, Tchervenkov J, et al. Tumor necrosis factor-alpha production by human islets leads to postisolation cell death. *Transplantation.* 2006;82:813-8.
8. Balibrea del Castillo JM, Vara-Ameigeiras E, Arias-Diaz J, Garcia Martin MC, Garcia-Perez JC, Balibrea Cantero JL. Estado actual del trasplante de islotes pancreáticos. *Cir Esp.* 2007;81:177-91.
9. Ryan EA, Paty BW, Senior PA, Bigam D, Alfadhli E, Kneteman NM, et al. Five-year follow-up after clinical islet transplantation. *Diabetes.* 2005;54:2060-9.
10. Gabryel B, Chalimoniuk M, Stolecka A, Waniek K, Langfort J, Malecki A. Inhibition of arachidonic acid release by cytosolic phospholipase A2 is involved in the antiapoptotic effect of FK506 and cyclosporin a on astrocytes exposed to simulated ischemia in vitro. *J Pharmacol Sci.* 2006;102:77-87.
11. Lagoda G, Jin L, Lehrfeld TJ, Liu T, Burnett AL. FK506 and sildenafil promote erectile function recovery after cavernous nerve injury through antioxidative mechanisms. *J Sex Med.* 2007;4(4 Pt 1):908-16.
12. Nir T, Melton DA, Dor Y. Recovery from diabetes in mice by beta cell regeneration. *J Clin Invest.* 2007;117:2553-61.
13. Robertson RP. Islet transplantation as a treatment for diabetes- A work in progress. *N Engl J Med.* 2004;350:694-705.
14. Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, Korbutt GS, Coth E, Warnock GL, et al. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med.* 2000;343:230-8.
15. Hüser N, Doll D, Altomonte J, Werner M, Kriner M, Preissel A, et al. Graft preconditioning with low-dose tacrolimus (FK506) and nitric oxide inhibitor aminoguanidine (AGH) reduces ischemia/reperfusion injury after liver transplantation in the rat. *Arch Pharm Res.* 2009;32:215-20.
16. Pereira R, Medeiros YS, Fröde TS. Antiinflammatory effects of Tacrolimus in a mouse model of pleurisy. *Transpl Immunol.* 2006;16:105-11.
17. Balibrea Del Castillo JM, García-Martín MC, Arias-Díaz J, Giné E, Vara E, Balibrea Cantero JL. Antiapoptotic effect of tacrolimus on cytokine challenged human islets. *Cell Transplant.* 2009, doi:10.3727/096368909 x 12483162197240.
18. Stover JF, Schoning B, Sakowitz OW, Woiciechowsky C, Unterberg AW. Effects of tacrolimus on hemispheric water content and cerebrospinal fluid levels of glutamate, hypoxanthine, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha following controlled cortical impact injury in rats. *J Neurosurg.* 2001;94:782-7.
19. St Peter SD, Moss AA, Mulligan DC. Effects of tacrolimus on ischemia-reperfusion injury. *Liver Transpl.* 2003;9:105-16.
20. Garcia-Criado FJ, Palma-Vargas JM, Valdunciel-Garcia JJ, Toledo AH, Misawa K, Gomez-Alonso A, et al. Tacrolimus (FK506) down-regulates free radical tissue levels, serum cytokines, and neutrophil infiltration after severe liver ischemia. *Transplantation.* 1997;64:594-8.
21. Hotchkiss RS, Strasser A, McDunn JE, Swanson PE. Cell death. *N Engl J Med.* 2009;361:1570-83.
22. Rabinovitch A, Suarez-Pinzon W, Strynadka K, Ju Q, Edelstein D, Brownlee M, et al. Transfection of human pancreatic islets with an anti-apoptotic gene (bcl-2) protects beta-cells from cytokine-induced destruction. *Diabetes.* 1999;48:1223-9.
23. Schaffer M, Fuchs N, Volker J, Schulz T, Kapischke M, Viebahn R. Differential effect of tacrolimus on dermal and intestinal wound healing. *J Invest Surg.* 2005;18:71-9.
24. Su Y, Shi Y, Shi YB. Cyclosporin A but not FK506 inhibits thyroid hormone-induced apoptosis in tadpole intestinal epithelium. *FASEB J.* 1997;11:559-65.
25. Hashimoto Y, Matsuoka N, Kawakami A, Tsuboi M, Nakashima T, Eguchi K, et al. Novel immunosuppressive effect of FK506 by augmentation of T cell apoptosis. *Clin Exp Immunol.* 2001;125:19-24.
26. Hui H, Khoury N, Zhao X, Balkir L, D'Amico E, Bullotta A, et al. Adenovirus-mediated XIAP gene transfer reverses the negative effects of immunosuppressive drugs on insulin secretion and cell viability of isolated human islets. *Diabetes.* 2005;54:424-33.
27. Kang CB, Tai J, Chia J, Yoon HS. The flexible loop of Bcl-2 is required for molecular interaction with immunosuppressant FK-506 binding protein 38 (FKBP38). *FEBS Lett.* 2005;579:1469-76.
28. Shirane M, Nakayama KI. Inherent calcineurin inhibitor FKBP38 targets Bcl-2 to mitochondria and inhibits apoptosis. *Nat Cell Biol.* 2003;5:28-37.