

El factor activador de las plaquetas (PAF) como mediador de la nefrotoxicidad inducida por ciclosporina A: Estudios en glomérulos aislados humanos y de rata

S. Lamas, A. Olivera, J. M. López Novoa *, G. Ortega, A. López Farré y D. Rodríguez Puyol

Laboratorio de Fisiopatología Renal. * Departamento de Nefrología y Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Fundación Jiménez Díaz. Madrid.

RESUMEN

Se analizan los efectos de la ciclosporina A (CsA) 10^{-6} M sobre la superficie de sección (SSG) de glomérulos aislados humanos y de rata. Experiencias similares fueron realizadas tras preincubación con antagonistas del factor activador de las plaquetas (PAF) (BN 52021, BN, 5×10^{-5} M) y con bloqueantes de los canales de calcio (verapamil, V, 10^{-5} M). Las SSG fueron medidas mediante un método computarizado. Igualmente se evaluó la capacidad de producción de PAF por parte de glomérulos aislados de rata incubados con CsA. Tanto los glomérulos de rata (tiempo 0: $1,55 \pm 0,02 \text{ m}^2 \times 10^{-8}$; tiempo 30: $1,45 \pm 0,02 \text{ m}^2 \times 10^{-8}$; $p < 0,001$) como los humanos (tiempo 0: $2,57 \pm 0,03 \text{ m}^2 \times 10^{-8}$; tiempo 30: $2,47 \pm 0,03 \text{ m}^2 \times 10^{-8}$; $p < 0,05$) mostraron una disminución en su SSG; en presencia de CsA al cabo de treinta minutos de incubación. Esto no se observó en los glomérulos controles. En aquellos preincubados durante diez minutos con BN o V, previamente a adición de la CsA, tampoco se observaron modificaciones significativas en la SSG. En glomérulos aislados de rata, la CsA indujo un aumento de la producción de PAF tras treinta minutos de incubación (glomérulos control: $175 \pm 15 \text{ pg/mg.}$; glomérulos con CsA: $404 \pm 15 \text{ pg/mg.}$; $p < 0,01$). Estos resultados sugieren que a través de una disminución en la superficie de filtración glomerular y, por consiguiente, en el coeficiente de ultrafiltración el PAF puede mediar la reducción aguda del filtrado glomerular inducida por la CsA.

Palabras clave: **PAF. Ciclosporina. Nefrotoxicidad.**

PLATELET-ACTIVATING-FACTOR (PAF) AS A MEDIATOR OF NEPHROTOXICITY INDUCED BY CYCLOSPORINE A. STUDIES ON HUMAN AND RAT ISOLATED GLOMERULI

SUMMARY

The effects of cyclosporine A 10^{-6} M on glomerular cross-sectional area (GCSA) of isolated human and rat glomeruli were tested. The same experiments were performed after preincubation with a platelet-activating-factor (PAF) antagonist (BN 52021, BN, 5×10^{-5} M) and a calcium channel blocker (verapamil, V, 10^{-5} M). Areas of glomeruli were measured by a computer-assisted

Correspondencia: Dr. Diego Rodríguez Puyol.
Laboratorio de Fisiopatología Renal.
Departamento de Nefrología.
Fundación Jiménez Díaz.
Avenida de los Reyes Católicos, 2.
28040 Madrid.

method. GCSA decreased after 30 min of incubation with CsA both in rat (time 0: $1.55 \pm 0.02 \text{ m}^2 \times 10^{-8}$; time 30: $1.45 \pm 0.02 \text{ m}^2 \times 10^{-8}$; $p < 0.001$) and in human (time 0: $2.57 \pm 0.03 \text{ m}^2 \times 10^{-8}$; time 30: $2.47 \pm 0.03 \text{ m}^2 \times 10^{-8}$, $p < 0.05$) glomeruli. This was not observed in control glomeruli. BN and V inhibited the CsA-induced glomerular contraction in both populations of glomeruli. In Addition, CsA 10^{-6} M increased PAF production by isolated rat glomeruli (control glomeruli: $175 \pm 15 \text{ pg/mg}$; CsA glomeruli: $404 \pm 15 \text{ pg/mg}$). These results suggest that CsA could reduce GFR by decreasing the glomerular ultrafiltration coefficient, perhaps as a consequence of the contraction of glomerular structures. PAF seems to play a pivotal role in the genesis of this action.

Key words: PAF. Cyclosporine. Nephrotoxicity.

Introducción

La ciclosporina A (CsA) constituye probablemente el mayor avance terapéutico de los últimos años en el campo del trasplante renal¹. Sin embargo, su nefrotoxicidad continúa siendo un problema importante². Dentro de las alteraciones renales inducidas por la CsA, ha ido recibiendo progresivamente una mayor atención su capacidad para producir un fracaso renal agudo funcional, reversible con la reducción o retirada de la droga³. Esto ha sido atribuido a modificaciones en las resistencias vasculares renales (RVR)⁴ en relación con modificaciones del sistema renina-angiotensina⁵, el sistema nervioso autónomo⁶ y determinados prostanoïdes^{5, 7}. Sin embargo, recientemente el grupo de Barros y cols.⁸ ha sugerido que la CsA es capaz de modificar directamente el coeficiente de ultrafiltración (K_f), independientemente de los cambios en el flujo plasmático renal (FPR).

Por otra parte, el factor activador de las plaquetas (PAF) puede inducir una reducción en el FPR y en la tasa de filtración glomerular (TFG)⁹. Además, recientemente se ha demostrado que esta sustancia es capaz de contraer tanto los glomérulos aislados¹⁰ como las células mesangiales de rata en cultivo^{11, 12}. A su vez, estas estructuras son capaces de producir PAF¹³.

En el presente trabajo hemos intentado analizar la hipótesis de que la reducción aguda en el filtrado glomerular inducida por la CsA podría estar mediada por la producción de PAF. Para ello se ha trabajado con glomérulos aislados humanos y de rata, intentando evitar así las múltiples interferencias existentes «in vivo», asumiendo que los cambios en la superficie glomerular pueden ser un marcador indirecto de modificaciones en el K_f ^{14, 15}. Estos glomérulos aislados han sido incubados con o sin CsA, en presencia de inhibidores de la interacción del PAF con sus receptores¹⁶. Igualmente se ha determinado la capacidad de estos glomérulos para producir PAF en presencia de CsA. Finalmente, se ha intentado evaluar el posible papel del calcio en la producción de estas acciones.

Material y métodos

1. Aislamiento de glomérulos. Los glomérulos de rata fueron obtenidos en animales de la cepa Wistar, que pesaban entre 150-200 g. de peso, mantenidos con una dieta estándar y con una ingesta libre de líquidos. Tras anestesiarlos con éter se realizó una incisión en la línea media abdominal, procediéndose a cateterizar la aorta en su bifurcación. A continuación se perfundieron los riñones con una solución isotónica de NaCl heparinizada (50 mg. de heparina sódica en 500 ml. de solución, 4° C). Se separó después la corteza de la médula mediante disección macroscópica, sometiéndose posteriormente un homogeneizado cortical a un proceso de tamizado diferencial (tamices de 105 y 75 μm). Los glomérulos aislados quedaron retenidos en este último tamiz. Se obtuvo así una preparación consistente en glomérulos sin cápsulas de Bowman ni arteriolas aferentes o eferentes, con una contaminación tubular inferior al 5 %. Todo este proceso de aislamiento fue realizado con el mismo tampón (tampón A: tris 20 mM, ClNa 130 mM, ClK 10 mM, acetato de sodio 10 mM, glucosa 5 mM, pH = 7,45) y a 4° C. La técnica ha sido descrita previamente¹⁷.

Los glomérulos humanos fueron aislados de forma muy similar, atendiendo también a descripciones previas¹⁸. Los riñones utilizados provenían de las organizaciones de trasplante de la zona Centro, tratándose de órganos que no fueron considerados apropiados para ser injertados. Se perfundió el riñón con una solución isotónica fría heparinizada, similar a la descrita previamente, procediéndose posteriormente a la separación macroscópica de la corteza y la médula. El homogeneizado cortical se procesó de forma superponible a la descrita para las ratas, aunque los tamices utilizados fueron respectivamente de 180 y 105 μm . Una vez obtenidos los glomérulos en este último tamiz, con una mínima contaminación de elementos tubulares y vasculares, se procedió a su almacenamiento en N_2 líquido. La temperatura de trabajo y el tampón de aislamiento fueron iguales que los utilizados en el caso de las ratas.

2. Incubaciones. Los glomérulos de rata, en todos los casos, fueron obtenidos en el mismo día de su utilización. En el caso de los glomérulos humanos se utilizaron siempre suspensiones tras descongelación. Antes de cada experimento se procedió a lavar dos veces las suspensiones glomerulares, añadiendo a cada una de ellas 10 ml. de tampón A y centrifugando a continuación a 1.000 r.p.m. durante un minuto a 4° C. Los glomérulos así obtenidos fueron resuspendidos en 1 ml. de tampón A, conteniendo una concentración final de Ca^{++} de 2,5 mM. Tras quince minutos en estas condiciones se comenzaron los experimentos. En una primera fase se incubaron glomérulos tanto de rata como humanos, en presencia de CsA (10^{-6} M de concentración final) a temperatura ambiente, a la vez que se realizó una incubación de glomérulos control. Dado que la CsA llevaba una cierta proporción de etanol como disolvente, la concentración final de etanol en los glomérulos controles (0,1 %) fue similar a la que había en los glomérulos con CsA. En otro grupo de experimentos se preincubaron ambos tipos de glomérulos con BN 52021 (5×10^{-5} M) (Instituto Henri Beaufour, París, Francia) durante diez minutos a temperatura ambiente, añadiendo posteriormente CsA a la concentración descrita previamente (BN + CsA). En tercer lugar se realizaron unas incubaciones absolutamente superponibles a las previamente descritas, pero utilizando verapamil (V 10^{-5} M) (Knoll, Madrid, España) en lugar de BN 52021 (V + CsA).

Finalmente se procedió a evaluar la producción de PAF en presencia o ausencia de CsA. Teniendo en cuenta que la producción de esta sustancia hay que expresarla como una función de la cantidad total de proteína glomerular, se procedió a ajustar inicialmente la concentración de proteínas en torno a 1,5 mg/ml. Además, se añadió fenil-metil-sulfonil fluoruro (PMSF, 10^{-3} M de concentración final) a los medios de incubación. A continuación, alícuotas de 1 ml. de esta suspensión se incubaron en presencia ($n = 4$) o ausencia ($n = 4$) de CsA 10^{-6} M. Tras treinta minutos de incubación, los tubos fueron rápidamente centrifugados (3.000 r.p.m., cinco minutos, 4° C), separándose los sobrenadantes y los precipitados, almacenándose unos y otros a -20° C hasta el momento de su análisis. Las proteínas fueron cuantificadas mediante el método descrito por Lowry y cols.¹⁹

3. Determinación de la superficie de sección glomerular^{20, 21}. Alícuotas de 100 μ l de suspensiones glomerulares fueron colocadas en portas excavados mantenidos a temperatura ambiente ($22 \pm 2^\circ$ C), siendo observados en contraste de fase con un fotomicroscopio Olympus invertido (Olympus IMT 2, Shivya-Hu, Tokio, Japón) con una magnificación de 150 veces. Se realizaron fotografías en condiciones basales ($t = 0$, antes de añadir la CsA) y a los treinta

minutos de incubación. Se recogieron entre 30-50 glomérulos por fotografía. La SSG se determinó mediante técnicas planimétricas utilizando un lápiz óptico acoplado a un ordenador (Cardio-80, Kontron Medical, República Federal Alemana). Las superficies reales se calcularon tras corregir para los factores de magnificación del microscopio y de la fotografía. Todas las medidas fueron realizadas por dos investigadores diferentes, desconociendo ambos las condiciones experimentales de cada fotografía.

4. Cuantificación de la producción del PAF. Previamente a su cuantificación se procedió a extraer el PAF tanto de los sobrenadantes de los medios de incubación como de los precipitados. La técnica ha sido descrita previamente²² y se basa en la utilización de cartuchos de sílice (Sep-Pak, Waters, Milford MA, USA) y en la elución progresiva con solventes de polaridad variable. La recuperación del procedimiento era del 70-80 %, separándose completamente el PAF de otras sustancias con capacidad agregante como el TxA_2 o los propios restos de CsA. Tras la extracción, la cantidad de PAF detectable mediante bioensayo se cuantificó utilizando plaquetas de conejo marcadas previamente con ^3H -serotonina (Amersham, Buckinghamshire, Inglaterra), según técnicas ya descritas²³.

5. Análisis estadístico. Todos los resultados se expresan como $\bar{x} \pm \text{eem}$. En las experiencias de SSG, las comparaciones entre los grupos se realizaron mediante análisis de varianza simple, realizándose posteriormente una comparación múltiple de medias según el método de Scheffe. Con respecto a la producción de PAF, las comparaciones fueron realizadas mediante las pruebas de Kruskal-Wallis y de Mann-Whitney. Se consideró significativa una $p < 0,05$.

Resultados

La figura 1 muestra las SSG de glomérulos aislados de rata en presencia de CsA, de BN 52021 + CsA y de V + CsA, comparándolos con los controles. En condiciones basales no hubo diferencias entre las SSG de los cuatro grupos experimentales. Al cabo de treinta minutos las SSG de los glomérulos controles y de aquellos preincubados con BN 52021 y V permanecieron similares a los basales, mientras que en el caso de la CsA se observó una significativa reducción de este parámetro en comparación con las cifras basales y también en relación con los valores a los treinta minutos de los grupos control y BN + CsA.

En el caso de los glomérulos humanos (fig. 2), los resultados fueron semejantes. La CsA indujo una reducción significativa en la SSG, que fue inhibida mediante la preincubación con BN 52021 y V. Desde un punto de vista cuantitativo, esta reducción fue

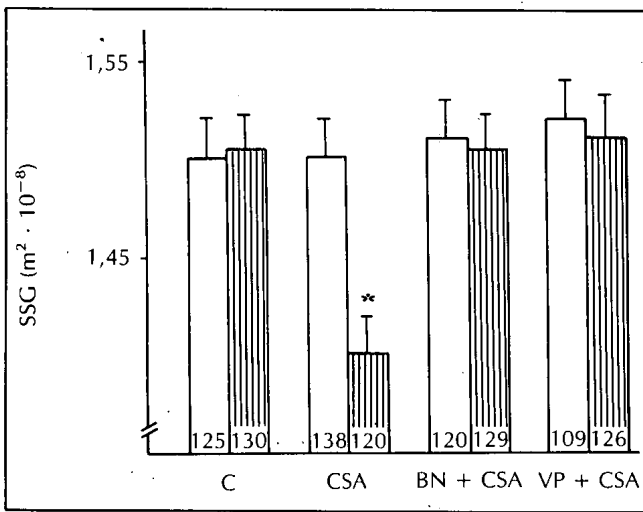


Fig. 1.—Variaciones en la superficie de sección glomerular (SSG) de glomerulos aislados de rata tras ser incubados durante treinta minutos en condiciones controles (C), con ciclosporina A 10^{-6} M (CsA), con BN 52021 5×10^{-5} y ciclosporina A 10^{-6} M (BN + CsA) y con verapamil 10^{-5} M y ciclosporina A 10^{-6} M (V + CsA). Las barras blancas representan los valores en condiciones basales, mientras que las rayadas son los valores a los treinta minutos. Los números entre paréntesis representan el número total de glomerulos medidos. * $p < 0,05$ vs valores basales.

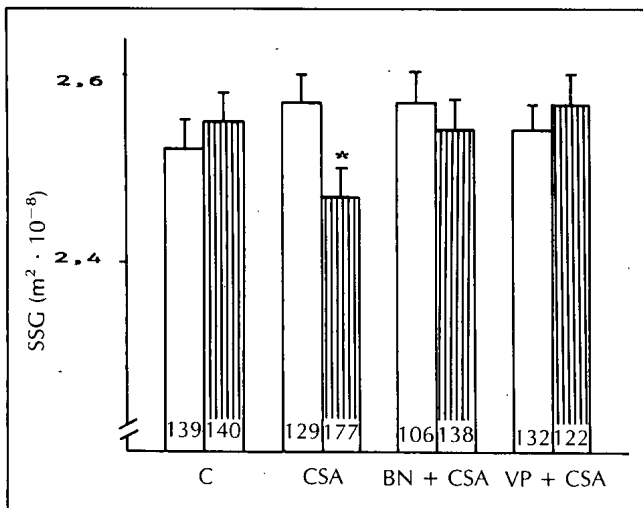


Fig. 2.—Variaciones en la superficie de sección glomerular (SSG) de glomerulos humanos aislados tras ser incubados durante treinta minutos en condiciones controles (C), con ciclosporina A 10^{-6} M (CsA), con BN 52021 5×10^{-5} y ciclosporina A 10^{-6} M (BN + CsA) y con verapamil 10^{-5} M y ciclosporina A 10^{-6} M (V + CsA). Las barras blancas representan los valores en condiciones basales, mientras que las rayadas son los valores a los treinta minutos. Los números entre paréntesis representan el número total de glomerulos medidos. * $p < 0,05$ vs valores basales.

menor que en el caso de las ratas, ya que supuso sólo un 5 % de variación con respecto a la superficie

glomerular inicial, mientras que los glomerulos de rata se contrajeron en torno a un 8 %.

En glomerulos aislados de rata, la CsA indujo un incremento significativo en la producción de PAF, que pudo ser detectado tanto en el sobrenadante como en el precipitado de los medios de incubación (tabla I).

Discusión

La CsA induce una reducción significativa en la SSG de glomerulos aislados, tanto en ratas como en humanos. Este efecto se inhibe totalmente mediante la utilización de sustancias que antagonizan la unión del PAF a sus receptores, como el BN 52021, y con calcioantagonistas, como el V.

El significado y la interpretación de los estudios que se basan en el análisis de la SSG continúan siendo un tema de debate en el momento actual. En primer lugar, las variaciones cuantitativas observadas en este tipo de experimentos no son muy importantes y, en cualquier caso, son siempre inferiores a las descritas para células mesangiales. En los presentes resultados, las variaciones observadas no superaban, en el mejor de los casos, un 8 % con respecto a los valores basales, lo que podría hacer pensar que estos hallazgos no tendrían una gran importancia fisiológica. No obstante, las variabilidades intra e interensayo²⁴ de la técnica son tan bajas y el número de elementos analizado tan elevado que las significaciones estadísticas son muy fiables. El hecho de que los valores basales sean comparables en todos los casos apoya fuertemente la hipótesis de que los valores encontrados no son debidos al azar. Además, estas pequeñas variaciones en las SSG, sobre todo en comparación con parámetros similares obtenidos en células, han sido demostradas previamente por nosotros y por otros autores al incubar glomerulos aislados^{14, 20, 21, 24}. En segundo lugar, no ha sido posible comprobar, hasta el momento, que una reducción en la SSG sea un índice directo de medida de una hipotética reducción en la superficie de filtración glomerular. Serían necesarias experiencias complejas, capaces de detectar no sólo cambios en la superficie de sección aparente, sino también modificaciones concomitantes en la superficie de filtración verdadera, para poder afirmar la existencia de una relación directa entre estos dos parámetros. Sin embargo, y hasta que este tipo de estudios sean factibles, la mayor parte de los autores^{14, 15} consideran que una reducción en la SSG, en presencia de determinados mediadores humorales, puede ser un índice indirecto que informe de posibles modificaciones en la superficie de filtración glomerular.

Teniendo en cuenta estas consideraciones podemos sugerir que la importancia de nuestros resultados

Tabla I. Producción de PAF por glomérulos aislados de rata

| | PRODUCCION DE PAF | | |
|-------------|-------------------|-----------|------------|
| | MI | G | T |
| C (n = 4) | 20 ± 3 | 155 ± 17 | 175 ± 15 |
| CsA (n = 4) | 120 ± 12 * | 285 ± 3 * | 404 ± 15 * |

Los resultados se expresan en pg de PAF por mg. de proteína glomerular, mostrándose las $X \pm eem$. C: Glomérulos control. CsA: Glomérulos incubados con ciclosporina A. MI: Medio de incubación. G: Glomérulos. T: Cantidad total. * $p < 0,05$ vs control.

radica en el hecho de que la CsA, probablemente a través de un efecto directo sobre la superficie de filtración glomerular, podría inducir una reducción en el K_f , condicionando así una disminución del filtrado glomerular. Esto no descarta que la CsA pueda también ejercer sus efectos sobre la función renal mediante la modificación de otros determinantes del filtrado, como el FPR o la presión hidrostática intraglomerular. Aunque no existen referencias previas de resultados «in vitro» que confirmen nuestros hallazgos, es importante resaltar que los resultados del grupo de Barros y cols.⁸ apoyan nuestra hipótesis de forma muy directa. Estos autores han sido capaces de demostrar, con técnicas de micropunción en glomérulos subcapsulares, que entre los distintos determinantes de la filtración glomerular que la CsA es capaz de modificar, uno de ellos es el K_f .

El mecanismo responsable de la reducción de la SSG inducida por CsA no ha sido analizado directamente en estos experimentos. Aunque diversas hipótesis podrían ayudarnos a explicar los resultados obtenidos, la mayor parte de los autores creen que ese tipo de acciones son una consecuencia de la contracción de las células mesangiales intraglomerulares^{14, 15, 25, 26}. En este sentido se ha demostrado que la CsA es capaz de inducir una contracción importante en células mesangiales de rata en cultivo, mecanismo que podría verse implicado en la génesis de los efectos glomerulares observados.

El BN 52021 es un extracto natural del ginkgo biloba, capaz de inhibir la interacción del PAF con sus receptores específicos¹⁶. Esta sustancia bloquea el efecto contráctil de la CsA en glomérulos aislados, humanos y de rata. En ese sentido, la hipótesis de trabajo sería que la incubación de glomérulos aislados con CsA induciría un incremento en la síntesis de PAF, el cual, interaccionando con receptores específicos glomerulares, podría contraer estas estructuras. Esta hipótesis no descarta la existencia de otros mediadores intermedios, posibles determinantes de las acciones de la CsA.

Para confirmar estos postulados sería necesario aclarar tres aspectos fundamentales. En primer lugar, la capacidad de la CsA para incrementar la producción de PAF por parte de estructuras glomerulares aisladas. Schlondorff y cols.¹³ han demostrado pre-

viamente que tanto los glomérulos como las células mesangiales de rata en cultivo son capaces de producir PAF en pequeñas cantidades. Nosotros hemos intentado mejorar su técnica, inhibiendo la actividad de las hidrolasas intracelulares¹⁶ mediante el uso de PMSF. De esta forma hemos obtenido una producción basal de PAF superior a la descrita previamente¹³. En estas condiciones experimentales, la incubación con CsA indujo un notable incremento en la producción de PAF por parte de glomérulos aislados de rata. En segundo lugar es necesario aceptar la capacidad del PAF para contraer glomérulos aislados. Esto ha sido demostrado previamente por nuestro grupo de trabajo¹⁰, habiendo sido señalada igualmente la capacidad de esta sustancia para contraer las células mesangiales en cultivo¹¹. Finalmente, mediante el uso de radioligandos, habría que demostrar directamente la presencia de receptores específicos del PAF a nivel glomerular, lo que no ha sido logrado hasta el momento.

El bloqueo de los canales de calcio mediante el uso de V ha demostrado también ser efectivo a la hora de prevenir la contracción glomerular inducida por CsA. Esto hace suponer que un flujo incrementado de calcio desde el espacio extracelular hacia el intracelular puede jugar un papel importante en la contracción inducida por la CsA. A este respecto es importante recordar que el V es también capaz de inhibir la contracción glomerular inducida por el PAF¹⁰. Así pues, intentando relacionar todos los datos de que disponemos, se puede sugerir que el efecto primario de la CsA sobre glomérulos aislados es un incremento en la producción de PAF que, tras interaccionar con sus receptores, condicionaría un incremento en los flujos de calcio desde el exterior hacia el interior de la célula, determinando así la contracción glomerular.

Un aspecto importante de los presentes resultados son los hallazgos concernientes a los glomérulos humanos. En general, los trabajos en animales de experimentación arrojan siempre dudas acerca de la importancia de los mismos en la especie humana. En los resultados mostrados previamente, los datos en humanos confirman los obtenidos en animales de experimentación, si bien las variaciones cuantitativas son menores. Esto podría deberse a los procedimientos

tos de congelación y descongelación a los que fueron sometidos los glomérulos humanos. La inhibición de la contracción glomerular por parte del BN 52021 y el V concuerdan además con determinados datos obtenidos en la clínica humana, en el sentido de que estas drogas pueden prevenir la toxicidad renal inducida por CsA en pacientes trasplantados^{27, 28}.

En resumen, la reducción aguda de la filtración glomerular inducida por la CsA puede guardar relación con la contracción glomerular que produce. El PAF parece jugar un papel fundamental en la mediación de estos efectos. El bloqueo de la interacción del PAF con sus receptores o de sus mecanismos de acción intracelular pueden resultar de gran ayuda en el manejo de la toxicidad renal debida a CsA.

Agradecimientos:

Querriamos agradecer al doctor Hernando Avendaño la revisión cuidadosa y la acertada crítica del presente manuscrito. Parte de este trabajo fue realizado con ayudas del FISS y de la CAICYT (590/84). Querriamos dar las gracias al doctor Braquet, del Instituto Henri Beaufour, por proporcionarnos el BN 52021, y al Laboratorio Sandoz por la ciclosporina A. Igualmente, querriamos dar las gracias a las organizaciones de trasplante de la zona Centro por facilitarnos los riñones humanos.

Bibliografía

- Cohen DJ, Loertscher R, Rubin MF, Tilney NL, Carpenter CB y Strom TB: Cyclosporin: A new immunosuppressive agent for organ transplantation. *Ann Intern Med* 101:667-682, 1984.
- Flechner SM, Van Buren C, Kerman RH y Kahan DB: The nephrotoxicity of cyclosporine in renal transplant recipients. *Transplant Proc* 15 (suppl 1):2689-2694, 1983.
- Myers BD: Cyclosporine nephrotoxicity. *Kidney Int* 30:964-974, 1986.
- Sullivan BA, Hak LJ y Finn WF: Cyclosporine nephrotoxicity: studies in laboratory animals. *Transplant Proc* 17:145-154, 1984.
- Murray BM, Paller MS y Ferris TF: Effect of cyclosporine administration on renal hemodynamics in conscious rats. *Kidney Int* 28:767-774, 1985.
- Murray BM y Paller MS: Beneficial effect of renal denervation and prazosin on GFR and renal blood flow after cyclosporine in rats. *Clin Nephrol* 25:537-539, 1986.
- Palestine AG, Nussenblatt RB y Chan CC: Side effects of systemic cyclosporine in patients not undergoing transplantation. *Am J Med* 77:652-656, 1984.
- Barros JM, Boim MA, Ajzen H, Ramos OL y Schor N: Glomerular hemodynamics and hormonal participation on cyclosporine nephrotoxicity. *Kidney Int* 32:19-25, 1987.
- Camussi G: Potential role of platelet-activating factor in renal pathophysiology. *Kidney Int* 29:469-477, 1986.
- Arriba G, Barrio V, Hernando L, López-Novoa JM y Rodríguez-Puyol D: Changes in glomerular cross-sectional area induced by platelet-activating factor. *Nephrol Dial Transplant* 2:224-227, 1987.
- Schlondorff D, Satriano JA, Hagege J, Pérez J y Baud L: Effect of platelet-activating factor and serum-treated zymosan on prostaglandin E₂ synthesis, arachidonic acid release and contraction of cultured rat mesangial cells. *J Clin Invest* 73:1227-1231, 1986.
- Arriba G, Caramelo C, Olivera A, Lamas S, Rodríguez-Puyol D, Schrier RW y López-Novoa JM: A role for calcium in platelet-activating factor contraction of rat renal glomerular mesangial cells. *Am J Physiol* (en prensa).
- Schlondorff D, Goldwasser P, Neuwirth R, Satriano JA y Clay KL: Production de platelet-activating factor in glomeruli and cultured glomerular mesangial cells. *Am J Physiol* 250:F1123-1127, 1986.
- Kreisberg JI: Contractile properties of the glomerular mesangium. *Federation Proc* 42:3053-3057, 1983.
- Scharsmidt LA, Douglas JG y Dunn MJ: Angiotensin II and eicosanoids in the control of glomerular size in the rats and humans. *Am J Physiol* 250:F348-356, 1986.
- Braquet P, Shen TY, Toqui L y Vargaftig B: Perspectives in platelet-activating factor research. *Pharmacol Rev* 39:97-145, 1987.
- Rodríguez-Puyol D, Arriba G, Blanchart A, Santos JC, Caramelo C, Fernández-Cruz A, Hernando L y López-Novoa JM: Lack of a direct regulatory effect of atrial natriuretic factor on prostaglandin and renin release by isolated rat glomeruli. *Biochem Biophys Res Commun* 138:496-501, 1986.
- Ardaillou N, Hagege J, Nivez MP, Ardaillou R y Schlondorff D: Vasoconstrictor-evoked prostaglandin synthesis in cultured human mesangial cells. *Am J Physiol* 248:F240-246, 1985.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL y Randall RJ: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275, 1951.
- Barrio V, Arriba G, López-Novoa JM y Rodríguez-Puyol D: Atrial natriuretic peptide inhibits glomerular contraction induced by Angiotensin II and platelet-activating factor. *Eur J Pharmacol* 135:93-96, 1987.
- Rodríguez Puyol D, Lamas S, Olivera A, Ortega G, López Farré A, Hernando L y López Novoa JM: Actions of cyclosporine A on cultured rat mesangial cells. Enviado para publicación a *Kidney Int*.
- Caramelo C, Fernández Gallardo S, Marín Cao D, Iñarrea P, Santos JC, López Novoa JM y Sánchez Crespo M: Presence of platelet-activating factor in blood from human and experimental animals. Its absence in anephric individuals. *Biochem Biophys Res Commun* 120:789-796, 1984.
- Arriba G, Barrio V, Olivera A, Rodríguez Puyol D y López Novoa JM: Atrial natriuretic peptide inhibits angiotensin II-induced contraction of isolated glomeruli an cultured mesangial cells of rats: the role of calcium. *J Lab Clin Med* (en prensa).
- Simonson MS y Dunn MJ: Leukotriene C₄ and D₄ contract rat glomerular mesangial cells. *Kidney Int* 30:524-531, 1986.
- Ausiello DA, Kreisberg JI, Roy C y Karnovski MJ: Contraction of cultured mesangial cells of apparent mesangial origin after stimulation with Angiotensin II and arginin vasopresin. *J Clin Invest* 65:754-760, 1986.
- Iaina A, Herzog D, Cohen D, Gaveno S, Kapular S, Serbon I, Schiby G y Eliahou H: Calcium entry blockade with verapamil in Cyclosporine A plus ischemia induced acute renal failure in rats. *Clin Nephrol* 25 (S1):168-170, 1986.
- Pirotky E, Collietz Ph, Guilmard C, Schaeverbek J y Braquet P: Cyclosporine-induced nephrotoxicity: preventive effect of Paf-acether antagonist, BN 52063. *Transp Proc*, 1988 (en prensa).