

ORIGINALES

La ciclosporina A aumenta la síntesis glomerular y la excreción urinaria de tromboxano B₂ en ratas

T. Parra, G. de Arriba, G. Pérez de Lema*, I. Arribas*, S. Martín Carballido**, M. Rodríguez-Puyol* y D. Rodríguez-Puyol*

Sección de Nefrología. Unidad de Investigación. Hospital General Universitario. Universidad de Alcalá de Henares. Guadalajara.

* Departamento de Fisiología y Farmacología. Universidad de Alcalá de Henares.

** Servicio de Anatomía Patológica. Hospital General Universitario de Guadalajara. Universidad de Alcalá de Henares.

RESUMEN

Nuestro objetivo fue analizar los efectos de la ciclosporina A oral sobre la función renal, así como la excreción urinaria y la síntesis de tromboxano B₂ (metabolito del tromboxano A₂) por parte de glomérulos aislados de rata.

Se diseñaron experimentos dosis-respuesta (30, 50 y 70 mg/kg/día, durante diez días) y tiempo-respuesta (con 50 mg/kg/día durante cuatro, siete y diez días), y se determinó la síntesis de tromboxano B₂ en glomérulos aislados incubados durante treinta minutos a 37 °C. Asimismo, se evaluó la excreción urinaria de tromboxano B₂.

La ciclosporina A produjo un deterioro de la función renal dependiente de la dosis y del tiempo. Además indujo un aumento de la síntesis de tromboxano B₂ por parte de los glomérulos aislados, que fue dependiente de la dosis utilizada y del tiempo de tratamiento. El fármaco aumentó también la excreción urinaria de tromboxano B₂, que se correlacionó de modo inverso con el aclaramiento de creatinina.

En conclusión, la ciclosporina aumentó la excreción urinaria y la síntesis glomerular de tromboxano B₂, hecho que podría justificar, al menos en parte, su capacidad nefrotóxica.

Palabras clave: **Ciclosporina A. Tromboxano B₂. Nefrotoxicidad. Fracaso renal agudo. Glomérulos aislados.**

CYCLOSPORIN A INCREASES GLOMERULAR SYNTHESIS AND URINARY EXCRETION OF THROMBOXANE IN RATS

SUMMARY

It has been suggested that thromboxane could mediate nephrotoxicity induced by cyclosporin A. Our aim was to analyze kidney function, urinary excretion and synthesis of thromboxane by isolated glomeruli of rats treated short-term with cy-

Recibido: 13-X-95.

En versión definitiva: 26-I-96.

Aceptado: 5-II-96.

Correspondencia: Dr. Gabriel de Arriba de la Fuente.

Sección de Nefrología.

Hospital General Universitario de Guadalajara.

C/ Donante de Sangre, s/n.

19002 Guadalajara.

cyclosporin A. The drug was administered by oral cannulation. Dose-response (with 30, 50 and 70 mg/kg/day) and time-response (4, 7 and 10 days) experiments were performed.

Cyclosporin A reduced kidney function as evidenced by an increase of plasma creatinine and a decrease of creatinine clearance in a dose and time-dependent fashion.

Dose-response experiments showed an increase of urinary thromboxane after 10 days of treatment with cyclosporin A (n = 5 for each): Group 30 mg/kg/day 0.43 ± 0.20; Group 50 mg/kg/day 0.53 ± 0.30; Group 70 mg/kg/day 0.60 ± 0.27 pg/hour versus Group Control (0.13 ± 0.09 pg/hour).

Time-response experiments were done with a dose of cyclosporin A of 50 mg/kg/day (n = 5 for each group). Glomerular thromboxane increased with time (Basal: 0.18 ± 0.12, Day 4: 0.91 ± 0.70, Day 7: 1.04 ± 0.56, Day 10: 1.02 ± 0.77 ng/mg protein). Furthermore a progressive increase of urinary thromboxane was also observed as treatment progressed.

We conclude that short-term treatment with cyclosporin A reduces kidney function and increases glomerular and urinary thromboxane in rats. Furthermore, the increase of urinary thromboxane was inversely correlated with the clearance of creatinine. Our results suggest a possible role of thromboxane in nephrotoxicity induced by cyclosporin A.

Key words: Cyclosporin A. Thromboxane. Nephrotoxicity. Acute renal failure. Isolated glomeruli.

INTRODUCCION

La ciclosporina A (CyA) es un polipéptido fúngico que ha demostrado gran efectividad en la supresión de la respuesta inmune celular y humoral inhibiendo etapas iniciales en la activación de las células T^{1, 2}. Su peculiar y selectiva influencia sobre el sistema inmune la ha convertido en una droga de uso generalizado en el trasplante de órganos, y se está comenzando a utilizar con éxito en el tratamiento de otras enfermedades tales como diversas glomerulonefritis, uveítis, psoriasis, artritis reumatoide o diabetes mellitus insulín-dependiente^{3, 4}.

Uno de los principales inconvenientes del uso de la CyA es su toxicidad a nivel renal⁵⁻⁷, que aparece en un elevado porcentaje de pacientes tratados. Agudamente se caracteriza por la disminución del flujo plasmático renal y del filtrado glomerular, no se acompaña de alteraciones histológicas específicas, y es reversible al reducir la dosis⁸⁻¹⁰.

Para explicar estas alteraciones funcionales renales se invoca la participación de diversos sistemas vasoactivos como estimulación del eje renina-angiotensina-aldosterona¹¹, alteraciones del metabolismo de las prostaglandinas¹²⁻¹⁵ o del factor activador de las plaquetas¹⁶, liberación de endotelina¹⁷⁻¹⁹ o modificaciones del funcionalismo endotelial o en la síntesis de óxido nítrico²⁰⁻²³.

En varios estudios relacionados con el metabolismo de los eicosanoides se ha demostrado que la CyA provoca un aumento de la síntesis de vasoconstricto-

res, especialmente del tromboxano A₂, que podría justificar las alteraciones hemodinámicas agudas causadas por la droga a nivel renal²⁴⁻²⁸.

Nuestro objetivo ha sido establecer un modelo de nefrotoxicidad aguda en ratas tratadas por vía oral con CyA y analizar la síntesis de tromboxano B₂ (metabolito del tromboxano A₂, que es el eicosanoide activo *in vivo*), por parte de glomérulos aislados, así como su excreción urinaria y su posible relación con parámetros de funcionalidad renal.

MATERIAL Y METODOS

1. Material

Se utilizaron ratas Wistar macho de 250-300 g de peso, alimentadas con dieta de mantenimiento rataratón estándar (IPM-R20, Letica, Barcelona) y con libre acceso al agua de bebida. Se les administró CyA (Sandimmun, Sandoz, Basilea) mediante canulación oral una vez al día a las 9 horas de la mañana. A las ratas control no se les administró el vehículo del fármaco.

2. Métodos

A) Protocolo experimental

Se diseñaron experimentos dosis-respuesta (30, 50 y 70 mg/kg peso/día de CyA) durante diez días y tiempo-respuesta (cuatro, siete y diez días con una dosis de 50 mg/kg peso/día de CyA). Cada uno de los grupos se componía de cinco animales.

El día del sacrificio los animales se anestesiaron con éter etílico en campana y mediante punción en la bifurcación aórtica, se obtuvo sangre para determinaciones analíticas (tubos con heparina, 1.000 UI/ml) y de niveles de CyA (tubos con EDTA al 7,5 %). Una vez exanguinados se procedió a clampar la aorta por encima de las arterias renales y se perfundieron los riñones con solución salina isotónica a 4 °C (CINa al 0,9 %). Los riñones se recogieron sobre hielo y todas las etapas posteriores se llevaron a cabo a 4 °C.

Para el aislamiento de glomérulos se eliminaron las cápsulas renales y se separó la corteza de la médula. La corteza finamente dividida se sometió a un proceso de tamizado diferencial según un método descrito previamente²⁹. La pureza se determinó microscópicamente por conteo del número de partículas glomerulares y no glomerulares suspendidas en un volumen determinado, obteniéndose menos de un 5 % de contaminación tubular. Los glomérulos se recogieron sobre tampón Tris-glucosa (Tris 20 mM, CINa 130 mM, ClK 5 mM, acetato sódico 10 mM, glucosa 5 mM, pH 7,4) y se dejaron reposar 10-15 minutos. Tras centrifugar se retiró el sobrenadante y se repitió esta operación de lavado 3-4 veces. Se resuspendieron los glomérulos en 2 ml de tampón Tris-glucosa y se repartieron en tubos de ensayo para las determinaciones analíticas.

La muestra para análisis de tromboxano B₂ se incubó a 37 °C en baño de agua durante treinta minutos y, tras centrifugar a 1.500 g durante cinco minutos, se recogió el sobrenadante y se congeló a -80 °C hasta su procesamiento según método descrito previamente³⁰.

Además, se recogió orina de veinticuatro horas al comienzo y al final de cada experimento, introduciendo las ratas en jaulas metabólicas. Las muestras de orina se recogieron sobre Indometacina (5,10⁻⁵ M; Merck, Sharp & Dohme, Barcelona) y se acidificaron con ácido fórmico 2 M hasta un pH de 3-4. Se tomó 1 ml de orina y se extrajo con 2 ml de CHCl₃; la fase orgánica se evaporó en un evaporador centrífugo (Speed-Vac) y el extracto se resuspendió para su análisis en 300 µl de buffer fosfato 50 mM. La recuperación de la técnica es del 90-95 %.

3. Determinaciones analíticas

A) Analítica de sangre y orina

Se determinaron creatinina, urea, glucosa e iones en sangre y orina (Dimension AR, Dupont). Los niveles de CyA en sangre se obtuvieron mediante un inmunoensayo de polarización por fluorescencia (FPIA), después de diluir las muestras a 1:10 con tampón fosfato como estabilizante para la técnica (TDx Analyzer, Abbott).

B) Determinación de tromboxano B₂

Se llevó a cabo mediante un RIA con anticuerpos específicos para tromboxano B₂ (Sigma Inmuno Chemicals). Las muestras y estándares se incuban durante treinta minutos con anticuerpos anti-tromboxano B₂ a 4 °C; se añadió el estándar de tromboxano B₂ marcado con tritio y se mantuvo la mezcla a 4 °C durante una hora. Después de una etapa de separación con carbón activo/dextrano, la radiactividad del sobrenadante se midió en un contador de centelleo. La concentración de tromboxano B₂ se corrigió para el contenido de proteínas en las muestras de glomérulos, determinadas según el método de Lowry³¹.

La reactividad cruzada del ensayo con las prostaglandinas y sus metabolitos es menor de 0,1 % excepto para la prostaglandina F₂ alfa, que es de un 0,5 %. La sensibilidad del ensayo es de 2 pg/0,1 ml. El coeficiente de variación intraensayo es del 5-10 % y el interensayo del 12-15 %.

4. Análisis estadístico

Los datos se analizaron mediante test para muestras no paramétricas de Friedman, Kruskal-Wallis o Mann-Whitney. Los resultados se expresan como media ± error estándar y la significación estadística se fijó para p < 0,05.

RESULTADOS

Los niveles de CyA en los animales tratados durante diez días con una dosis de CyA de 50 mg/kg peso/día fueron de 5.987 ± 605 ng/ml.

Los animales tratados con CyA tienen una menor ganancia de peso que los controles. Esta menor ganancia de peso es más evidente al aumentar la dosis de CyA (tabla I), y se hace más patente sobre todo en los primeros días de tratamiento con el fármaco (tabla II). La ingesta de comida fue significativamente menor en los animales tratados con CyA respecto a los controles (tablas I y II).

La CyA produjo un deterioro de la función renal, manifestado por el aumento de creatinina plasmática y de urea, así como por un descenso del aclaramiento de creatinina, que fue dependiente de la dosis utilizada y del tiempo (tablas III y IV).

Respecto a los parámetros urinarios, se aprecia una disminución significativa de la natriuresis en los animales tratados con CyA, así como de la osmolaridad urinaria (tablas III y IV).

La síntesis de tromboxano B₂ por parte de glomérulos aislados aumentó de modo significativo en los

Tabla I. Incrementos de peso en ratas controles y ratas tratadas con CyA a diferentes dosis. La duración del tratamiento fue de diez días

	Control	Ciclosporina A (mg/kg/día)		
		30	50	70
Incremento de peso (g/día)	5,6 ± 0,2	2,4 ± 0,6*	1,6 ± 1,1*	0,8 ± 0,8*
Ingesta de comida (g/día)	25,7 ± 0,8	19,9 ± 1,3*	14,7 ± 1,4*	17,2 ± 1,0*

* p < 0,05 vs. control.

Tabla II. Incrementos de peso en ratas controles y ratas tratadas durante cuatro, siete y diez días con una dosis de CyA de 50 mg/kg peso/día

	Control	Ciclosporina A		
		4 días	7 días	10 días
Incremento de peso (g/día)	5,4 ± 0,5	0,5 ± 1,1*	1,1 ± 1,1*	3,3 ± 0,6*
Ingesta de comida (g/día)	24,9 ± 0,3	16,7 ± 0,1*	15,6 ± 0,8*	18,5 ± 1,5*

* p < 0,05 vs. control.

Tabla III. Parámetros analíticos en ratas controles y ratas tratadas con CyA durante diez días a dosis variables

	Control	Ciclosporina A (mg/kg/día)		
		30	50	70
Crea (mg/dl)	0,56 ± 0,04	0,66 ± 0,05	0,84 ± 0,04*	0,93 ± 0,13*
Urea (mg/dl)	26,8 ± 3,6	67,4 ± 8,9*	104,2 ± 8,9*	92,7 ± 12,0*
CCr (ml/min/100 g)	0,54 ± 0,11	0,35 ± 0,04	0,22 ± 0,03	0,16 ± 0,06
Na (mmol/l)	137,0 ± 0,4	129,0 ± 1,5*	133,5 ± 1,3*	115,7 ± 0,9*
K (mmol)	4,2 ± 0,2	4,6 ± 0,2	4,5 ± 0,2	5,6 ± 0,3*
Gluc. (mg/dl)	182,0 ± 3,5	287,0 ± 4,9*	233,5 ± 5,6*	318,3 ± 14,0*
Exc. Na (μmol/min)	0,46 ± 0,02	0,32 ± 0,04*	0,26 ± 0,05*	0,29 ± 0,04*
Osmol. (mOsmol/kg)	1.627 ± 335	861 ± 352*	554 ± 80*	874 ± 80*

* p < 0,05 vs. control.

Tabla IV. Parámetros analíticos en ratas controles y ratas tratadas con 50 mg/kg peso/día de CyA en ensayos de diferente duración

	Control	Ciclosporina A		
		4 días	7 días	10 días
Crea (mg/dl)	0,56 ± 0,04	0,58 ± 0,02	0,70 ± 0,06*	0,84 ± 0,04*
Urea (mg/dl)	26,8 ± 3,6	39,3 ± 4,4	52,4 ± 4,2*	104,2 ± 8,9*
CCr (ml/min/100 g)	0,54 ± 0,11	0,42 ± 0,06	0,32 ± 0,04*	0,22 ± 0,03*
Na (mmol/l)	137,0 ± 0,4	138,5 ± 1,2	129,6 ± 2,2*	133,5 ± 1,3*
K (mmol)	4,2 ± 0,2	4,6 ± 0,2	4,5 ± 0,2	4,5 ± 0,2
Gluc. (mg/dl)	182,0 ± 3,5	195,0 ± 3,59*	263,8 ± 24,4*	233,5 ± 21,0*
Exc. Na (μmol/min)	0,46 ± 0,02	0,31 ± 0,02*	0,28 ± 0,04*	0,26 ± 0,05*
Osmol. (mOsmol/kg)	1.627 ± 335	514 ± 67*	453 ± 67*	554 ± 80*

* p < 0,05 vs. control.

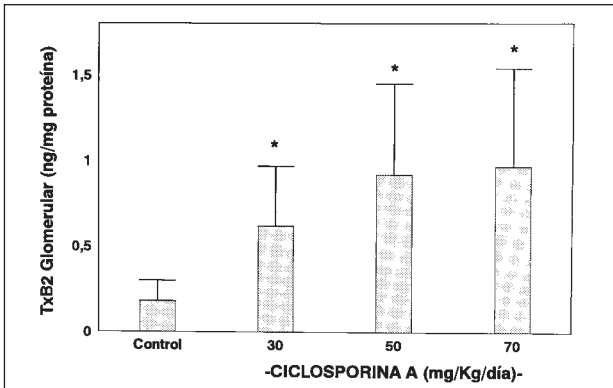


Fig. 1.—Tromboxano B₂ glomerular (ng/mg proteína) en ratas controles y en tratadas con CyA a una dosis de 30, 50 y 70 mg/kg/día durante diez días (n = 5). * p < 0,05.

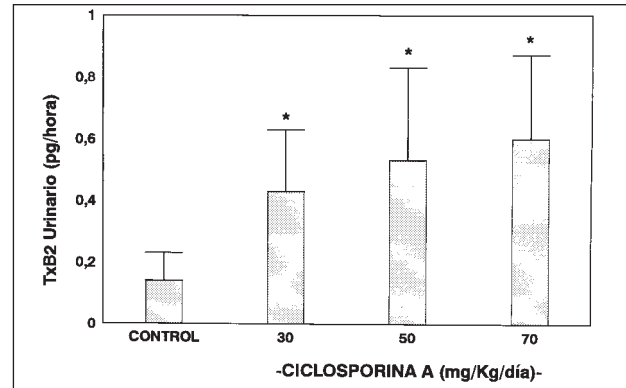


Fig. 3.—Tromboxano B₂ urinario (pg/hora) en ratas controles y en tratadas con CyA a una dosis de 30, 50 y 70 mg/kg/día durante diez días (n = 5). * p < 0,05.

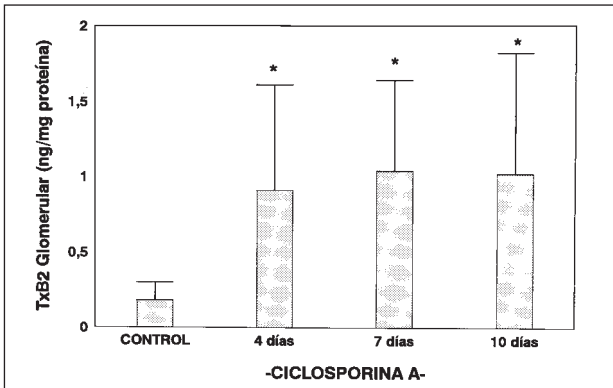


Fig. 2.—Tromboxano B₂ glomerular (ng/mg proteína) en ratas controles y tratadas con CyA a una dosis de 50 mg/kg/día durante cuatro, siete y diez días (n = 5). * p < 0,05.

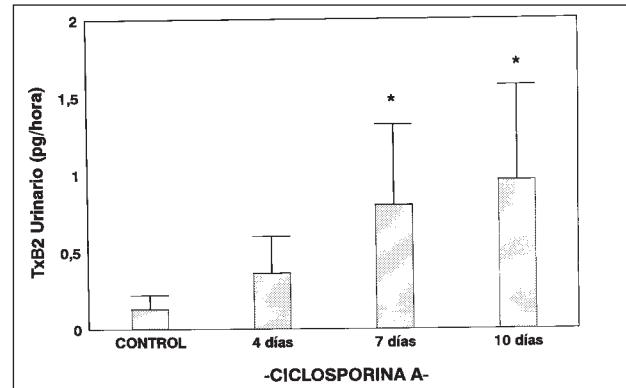


Fig. 4.—Tromboxano B₂ urinario (ng/mg proteína) en ratas controles y tratadas con CyA a una dosis de 50 mg/kg/día durante cuatro, siete y diez días (n = 5). * p < 0,05.

animales tratados con CyA respecto a los controles (figs. 1 y 2). El aumento presenta relación con la dosis utilizada (fig. 1) y también con el tiempo de tratamiento (fig. 2).

Se observa un aumento en la excreción urinaria de tromboxano B₂, dosis (fig. 3) y tiempo (fig. 4) dependiente.

Finalmente, hemos obtenido una correlación inversa (r = 0,985) entre la excreción urinaria de tromboxano B₂ y el aclaramiento de creatinina en los animales tratados con CyA en función del tiempo de tratamiento.

DISCUSION

Hemos analizado los efectos de la ciclosporina A oral sobre la función renal y la posible influencia de la droga sobre la síntesis glomerular y excreción urinaria de tromboxano B₂.

Observamos una menor ganancia de peso en los animales tratados con CyA, que fue dependiente de la dosis utilizada. El efecto de la CyA sobre el peso de los animales fue más acusado en los primeros días de tratamiento, como se manifestó en los experimentos tiempo-respuesta. Esta menor ganancia de peso puede justificarse por la disminución de ingesta de comida que se observa respecto a los controles³². No obstante, también pueden contribuir otros factores, como la insuficiencia renal inducida en los animales tratados^{11, 27, 28} o el aumento del estrés oxidativo celular condicionado por la CyA, como señalan otros autores³³.

La CyA produce un deterioro del filtrado glomerular y del flujo plasmático renal^{8, 9, 25, 34, 35}. El mecanismo no es bien conocido, aunque se ha postulado que podría estar relacionado bien con un aumento de las resistencias aferente y eferente, con modificaciones del Kf a través de la contracción de células mesangiales³⁶ o bien a través de daño endotelial di-

recto^{9,35}. Nosotros hemos confirmado el deterioro de la función renal, manifestado como un aumento de urea y creatinina plasmáticas, junto con un descenso del aclaramiento de creatinina, y hemos demostrado que este descenso fue dependiente de la dosis y del tiempo de tratamiento con CyA.

Observamos una discreta elevación de las cifras de potasio sérico en los animales tratados con CyA. Como ha sido descrito previamente, probablemente este fenómeno se deba tanto a una disminución de la síntesis de aldosterona en la suprarrenal⁸ como a una disminución de la secreción tubular distal de potasio¹⁰. El descenso del sodio plasmático observado tras tratamiento con CyA podría ser secundario tanto a la insuficiencia renal como a la hiperglucemia provocada por el fármaco. Finalmente, la CyA, a través de un daño tubular directo, podría alterar los mecanismos de concentración urinaria, dando lugar al descenso observado en la osmolaridad urinaria de los animales.

Se ha evidenciado en numerosos estudios que la CyA es capaz de aumentar la excreción urinaria de tromboxano B₂^{11,13,25-27}. No obstante, los diseños experimentales, dosis y vías de administración utilizados han sido muy variados, dificultando una interpretación global de los resultados^{8,35}.

Los inhibidores de la tromboxano sintetasa³⁷⁻⁴⁰ o los antagonistas para el receptor celular del tromboxano⁴¹⁻⁴⁵ evitan el descenso del filtrado glomerular inducido por la CyA, sugiriendo que el tromboxano puede determinar la nefrotoxicidad inducida por la CyA.

Demostramos que la CyA induce un aumento del tromboxano B₂ urinario de un modo dependiente del tiempo y de la dosis utilizada, hecho que podría sugerir que su efecto es específico. Además, esta elevación se correlacionó con el deterioro de la función renal observado en los animales, existiendo una correlación inversa significativa entre el tromboxano B₂ urinario y el aclaramiento de creatinina. Esta correlación indica que, al menos en parte, la síntesis de tromboxano podría contribuir a la nefrotoxicidad aguda inducida por la CyA.

El aumento del tromboxano en orina en respuesta a la CyA ha sido confirmado en varios estudios^{11,13,25,27}. Así, Perico y cols.¹¹ mostraron que la CyA a una dosis de 25 mg/kg oral durante cuarenta y cinco días aumenta el tromboxano B₂ urinario antes incluso de que se produzca un descenso del filtrado glomerular. El origen del tromboxano en la orina no es bien conocido, pero podría provenir tanto de la circulación sistémica como de estructuras renales o de las células que infiltren el riñón.

Coffman y cols.¹³ observaron un aumento del tromboxano B₂ urinario en riñón postisquémico de-

nervado de animales tratados con CyA (50 mg/kg/peso durante cuatro días), lo que indica que se ha formado en el riñón y no a nivel sistémico. Este hecho ha sido confirmado por Benigni y cols.²⁵ al evidenciar que la CyA (50 mg/kg/oral durante treinta días) aumentó tanto la excreción urinaria de 2-3-dinor-tromboxano B₂ (formado en la circulación, plaquetas y macrófagos) como la de tromboxano B₂ (formado en el riñón).

En la actualidad no se conoce si el tromboxano urinario se forma a nivel glomerular o tubular, pero es sabido que en el glomérulo la síntesis de eicosanoides es cuantitativamente importante y que contribuyen a la regulación del filtrado glomerular en numerosas situaciones fisiológicas y fisiopatológicas^{46,47}.

Existen datos contradictorios en la literatura sobre la síntesis de tromboxano por parte del glomérulo^{11,25,48-51}. Burke⁴⁹ y Jacobs⁵¹ no encuentran modificaciones en animales tratados con CyA, pero Perico¹¹ y Benigni²⁵ observan un aumento de la síntesis del mismo. Quizá explique esta disparidad el hecho de que las dosis de CyA utilizadas por Perico y Benigni (25 y 50 mg/kg/día, respectivamente) son mucho más elevadas que las utilizadas por Bunke y Jacobs (5 y 10 mg/kg/día, respectivamente). Además, Perico¹¹ también observó que el aumento del tromboxano en glomérulos aislados precedió al deterioro de función renal inducido por la CyA.

El aumento del tromboxano glomerular podría originar un deterioro del filtrado glomerular a través de aumento en las resistencias aferente y eferente al glomérulo o bien a través de la contracción de las células mesangiales con descenso del Kf^{46,47,52,53}.

Analizamos la síntesis glomerular de tromboxano B₂ en ratas tratadas con CyA, con el fin de eliminar posibles influencias sistémicas, originadas en la circulación o en estructuras renales adyacentes al glomérulo. Además, hoy se considera que los efectos locales a nivel glomerular de muchos eicosanoides pueden ser de gran importancia en la regulación del filtrado glomerular, y el aumento local de vasoconstrictores o disminución de vasodilatadores puede justificar el deterioro de función renal observado en numerosas situaciones clínicas^{46,47,54}. Nuestros resultados han demostrado que la CyA aumenta la síntesis glomerular de tromboxano B₂ de un modo dependiente de la dosis y del tiempo, sugiriendo un efecto específico de la CyA sobre la formación de tromboxano por parte del glomérulo.

En definitiva, nuestros resultados confirman que la CyA aumenta la excreción urinaria de tromboxano B₂, así como la síntesis glomerular del mismo, indicando que al menos parte del tromboxano urinario puede originarse en el glomérulo. Por otra parte, el aumento de síntesis glomerular y excreción urinaria

de tromboxano B₂ es paralelo al deterioro de función renal originado por la CyA, sugiriendo la intervención del tromboxano en la nefrotoxicidad aguda de la CyA. Por lo tanto, estrategias destinadas a disminuir la síntesis glomerular o los efectos del tromboxano podrían ser útiles en la prevención y el tratamiento de la nefrotoxicidad aguda por CyA.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por la Beca FIS 93/19. T. Parra Cid es becaria (B.A.E.) del Fondo de Investigación Sanitaria.

Agradecemos la colaboración de los miembros de la Unidad de Investigación del Hospital General Universitario de Guadalajara y en particular al doctor Fernando Carballo Alvarez, así como a doña Inmaculada Batanero Blázquez y a doña Milagros Esteban Santamaría.

Bibliografía

1. Burchkard Jy Guggenheim B: Cyclosporine «in vivo» and «in vitro» supresion of rat T-lymphocyte function. *Inmunology* 36:753-757, 1979.
2. Flanagan WM, Corthesh B, Bram RJy Crabtree GR: Nucleur asociation of a T-cell transcription factor blocked by FK-506 and Cyclosporine. *Nature* 352:803-807, 1991.
3. Kahan BD: Cyclosporine. *N Eng JMed* 321:1725-1738, 1989.
4. Faulds D, Goa KL y Benfield P: Cyclosporin. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic use in immunoregulatory disorders. *Drugs* 45:953-1040, 1993.
5. Bohman SO, Klintham G, Ringden O, Sundelin B y Wilczek H: Interstitial fibrosis in human kidney grafts after 12 to 46 months of cyclosporine therapy. *Transplant Proc* 17:1168-1171, 1985.
6. Flechner SM, Van Buren G, Herman RH y Kahan BD: The nephrotoxicity of cyclosporine in renal transplant recipients. *Transplant Proc* 15:2689-2694, 1983.
7. Hows JM, Smith JM, Baughan A y Gordon-Smith EC: Nephrotoxicity in marrow graft recipients treated with cyclosporine. *Transplant Proc* 15:2708-2711, 1983.
8. Mason J The pathophysiology of Sandimmune (Cyclosporine) in man and animals. *Pediatr Nephrol* 4:554-574, 1990.
9. Cairns HS y Neild G: Cyclosporin nephrotoxicity. En: *Oxford Textbook of clinical nephrology*. Cameron S, Davison AM, Grünfeld JP, Kerr D y Ritz E (eds.). Oxford University Press. Oxford, 1992, pp. 1560-1569.
10. Thiel G: Experimental Cyclosporine A nephrotoxicity: a summary of the international workshop (Basle, April 24-26, 1985). *Clin Nephrol* 25:S205-S210, 1986.
11. Perico N, Zoja C, Benigni A, Ghilardi F, Gualandris L y Remuzzi G: Efecte of short-term cyclosporine administration in rats on renin-angiotensin and thromboxane A₂: possible relevance to the reduction in glomerular filtration rate. *JPharm Exp Ther* 239:229-235, 1986.
12. Casas A, Hotter G, Roselló-Catafau J, Fernández-Cruz L y Gelpi E: Prostanoids and cyclosporin-mediated nephrotoxicity in rats: a critical appraisal. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 52:49-53, 1995.
13. Coffman TM, Carr DR, Yarger WE y Klotman PE: Evidence that renal prostaglandin and thromboxane production is stimulated in chronic cyclosporine nephrotoxicity. *Transplantation* 43:282-285, 1987.
14. Elzinga L, Kelley VE, Houghton DC y Bennett VM: Modification of experimental nephrotoxicity with fish oil as the vehicle for cyclosporine. *Transplantation* 43:271-274, 1987.
15. Perico N, Benigni A, Zoja C, Delaini F y Remuzzi G: Funcional significance of exaggerated renal thromboxane A₂ synthesis induced by cyclosporin A. *Am JPhysiol* 251:F581-F587, 1986.
16. Dos Santos OF, Boim MA, Barros EJ, Pirotzky E, Braquet P y Schor N: Nephrotoxicity of cyclosporine: the role of platelet-activating factor and thromboxane. *Lipids* 26:1320-1323, 1991.
17. Bloom IT, Bentley FR y Garrison RN: Acute cyclosporine-induced renal vasoconstriction is mediated by endothelin-1. *Surgery* 114:480-487, 1993.
18. Kon V, Sugiura M, Inagami T, Harvie BR, Ichikawa I y Hoover RL: Role of endothelin in cyclosporine induced glomerular dysfunction. *Kidney Int* 37:1487-1491, 1990.
19. Fogo A, Hellings SE, Inagami T y Kon V: Endothelin receptor antagonism is protective in *in vivo* acute cyclosporine toxicity. *Kidney Int* 42:770-774, 1992.
20. De Nicola L, Thomson SC, Wead LM, Brown MR y Gabbai FB: Arginine feeding modifies cyclosporine nephrotoxicity in rats. *JClin Invest* 92:1859-1865, 1993.
21. Gallego MJ, López-Farré A, Riesco A, Montón M, Grandes SM, Barat A, Hernando L, Casado S y Caramelo CA: Blockade of endothelium-dependent responses in conscious rats by cyclosporin A: effect of L-arginine. *Am JPhysiol* 264:H708-H714, 1993.
22. Bobadilla NA, Tapia E, Franco M, López P, Mendoza S, García-Torres R, Alvarado JA y Herrera-Acosta J: Role of nitric oxide in renal hemodynamic abnormalities of cyclosporin nephrotoxicity. *Kidney Int* 46:773-779, 1994.
23. Amore A, Gianoglio B, Ghigo D, Peruzzi L, Porcellini MG, Bussolino F, Costamagna C, Cacace G, Picciotto G, Mazzucco, Sena LM y Coppo R: A possible role for nitric oxide in modulating the functional cyclosporine toxicity by arginine. *Kidney Int* 47:1507-1514, 1995.
24. Quereda C, Sabater J, Villafruela J, Revaldería JG, Marcén R y Ortuño J: Urinary thromboxane B₂ and cyclic AMP in cyclosporine-A-treated kidney transplantation. *Transplant Proc* 26:2604-2605, 1994.
25. Benigni A, Chiabrando C, Piccinelli, Perico N, Gavinelli M, Furci L, Patino O, Abbate M, Bertani T y Remuzzi G: Increased urinary excretion of thromboxane B₂ and 2,3-dinor-thromboxane B₂ in cyclosporine A nephrotoxicity. *Kidney Int* 34:164-174, 1988.
26. Bennett WM, Elzinga L y Kelley V: Pathophysiology of cyclosporine nephrotoxicity: role of eicosanoids. *Transplant Proc* 20:628-633, 1988.
27. Schnabel FR, Wait RB y Kahng KU: The relationship of urinary thromboxane excretion to cyclosporine nephrotoxicity. *Transplantation* 51:686-689, 1991.
28. Teraoka S, Sanaka T, Takahashi K, Toma H, Yamaguchi Y, Yagisawa T, Tanabe K, Sato H, Matsumura O, Nakajima I, Kawai T, Honda H, Fuchinoue S, Agishi T y Ota K: Stimulation of intrinsic prostacyclin synthesis and inhibition of thromboxane production to minimize cyclosporine nephrotoxicity. *Transplant Proc* 20 (Suppl 3):638-645, 1988.
29. Arriba G, Barrio V, Olivera A, Rodríguez-Puyol D y López-Novoa JM: Effect of atrial natriuretic peptide on angiotensin II-induced contraction of isolated glomeruli and cultured renal mesangial cells of rats. *JLab Clin Med* 111:466-474, 1988.

30. 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 prostaglandins and renin release by isolated rat glomeruli. *Biochem Biophys Res Commun* 138:496-502, 1985.
31. Lowry OH, Rosebrough NG, Farr AL y Randall RJ: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-269, 1951.
32. Bennett VJ, Detmar Jy Chang PL: Growth inhibition by cyclosporine A *in vivo* and *in vitro*. *Life Sci* 48:1455-1461, 1991.
33. Wang C y Salahudeen AK: Lipid peroxidation accompanies cyclosporine nephrotoxicity: effects of vitamin E. *Kidney Int* 47:927-934, 1995.
34. Petric R, Freeman D, Wallace C, McDonald J, Stiller C y Keown P: Amelioration of experimental cyclosporine nephrotoxicity by calcium channel inhibition. *Transplantation* 54:1103-1106, 1992.
35. Kopp JB y Klotman PE: Cellular and molecular mechanism of cyclosporin nephrotoxicity. *J Am Soc Nephrol* 1:162-179, 1990.
36. Rodríguez-Puyol D, Lamas S, Olivera A, López-Farré A, Ortega G, Hernando L y López-Novoa JM: Actions of cyclosporin A on cultured rat mesangial cells. *Kidney Int* 35:632-637, 1989.
37. Gladue RP y Newborg MF: The protective effects of the thromboxane synthetase inhibitor Dazmegrel on nephrotoxicity in cyclosporine-treated rats. *Transplantation* 52:837-841, 1991.
38. Smeesters C, Chaland P, Giroux L, Moutquin JM, Etienne P, Douglas F, Corman J, St-Louis G y Daloze P: Prevention of acute cyclosporine A nephrotoxicity by a thromboxane synthetase inhibitor. *Transplant Proc* 20:658-664, 1988.
39. Smith SR, Creech EA, Schaffer AV, Martin LL, Rakhit A, Douglas FL, Klotman PE y Coffman TM: Effects of thromboxane synthase inhibition with CGS 13080 in human cyclosporine nephrotoxicity. *Kidney Int* 41:199-205, 1992.
40. Grieve EM, Hawksworth GM, Simpson JG y Whiting PH: The reversal of experimental cyclosporin A nephrotoxicity by thromboxane synthetase inhibition. *Biochem Pharmacol* 45:1351-1354, 1993.
41. Conger JD, Kim GE y Robinette JB: Effects of angiotensin II, ETA, and TXA2 receptor antagonists on cyclosporin A renal vasoconstriction. *Am J Physiol* 267:F443-F449, 1994.
42. Spurney RF, Mayros SD, Collins D, Ruiz P, Klotman PE y Coffman T: Thromboxane receptor blockade improves cyclosporine nephrotoxicity in rats. *Prostaglandins* 39:135-146, 1990.
43. Perico N, Pasini M, Gaspari F, Abbate M y Remuzzi G: Co-participation of thromboxane A₂ and leukotriene C₄ and D₄ in mediating cyclosporine-induced acute renal failure. *Transplantation* 52:873-878, 1991.
44. Perico N, Rossini M, Imberti O, Malanchini B, Cornejo RP, Gaspari F, Bertani T y Remuzzi G: Thromboxane receptor blockade attenuates chronic cyclosporine nephrotoxicity and improves survival in rats with renal isograft. *J Am Soc Nephrol* 2:1398-1404, 1992.
45. Bunke M, Wilder L y Martin A: Protection of glomerular filtration rate by the thromboxane receptor antagonist L655,240 during low dose cyclosporine administration. *Prostaglandins* 43:351-360, 1992.
46. Mené P y Dunn MJ: Vascular, glomerular, and tubular effects of angiotensin II, kinins, and prostaglandins. En: *The kidney. Physiology and pathophysiology*. Second Edition. Seldin DW y Giebisch G (eds.). Raven Press, New York, 1992, pp. 1205-1248.
47. Remuzzi G, Fitzgerald GA y Patrono C: Thromboxane synthesis and action within the kidney. *Kidney Int* 41:1483-1493, 1992.
48. Persan L, Kaskel F, Barnett R, Wilson T, Moore L, Arbeit L y Schlondorff D: Altered renal prostaglandin (PG) and thromboxane production in cyclosporine nephrotoxicity. *Kidney Int* 35:508A, 1989.
49. Bunke M, Wilder L y McLeish K: Effect of cyclosporine on glomerular prostaglandin production. *Transplant Proc* 20 (Suppl 3):646-649, 1988.
50. Stahl RAK y Kudelka S: Chronic cyclosporine A treatment reduces prostaglandin E₂ formation in isolated glomeruli and papilla of rat kidneys. *Clin Nephrol* 25 (Suppl 1):S78-S82, 1986.
51. Jacobs A, Bunke M y Wilder L: Effect of cyclosporine (CyA) on angiotensin II and norepinephrine stimulated glomerular prostaglandin production. *Kidney Int* 35:409A, 1989.
52. Baylis C: Effects of administered thromboxane on the intact, normal rat kidney. *Renal Physiol* 10:110-121, 1987.
53. Scharschmidt LA, Lianos E y Dunn MJ: Arachidonate metabolites and the control of glomerular function. *Fed Proc* 42:3058-3063, 1983.
54. Garrick RE: The renal eicosanoids. En: *Hormones, autacoids, and the kidney*. Stein JH, Goldfarb S y Ziyadeh FN (eds.). Churchill Livingstone, New York, 1991, pp. 231-261.