

Efecto de la vitamina E sobre la nefrotoxicidad de la ciclosporina A

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

Unidad de Investigación. *Sección de Nefrología. Hospital General Universitario de Guadalajara. Departamento de Medicina. Universidad de Alcalá de Henares. **Departamento de Fisiología y Farmacología. Universidad de Alcalá de Henares.

RESUMEN

Las especies reactivas de oxígeno han sido implicadas en la nefrotoxicidad de la ciclosporina A (CyA), bien directamente o bien a través de la activación de la peroxidación lipídica. Hemos demostrado previamente que la CyA provoca un aumento de la síntesis glomerular y de la excreción urinaria de tromboxano B₂ (TXB₂) en ratas.

Nuestro objetivo fue evaluar el efecto que el antioxidante vitamina E (VitE) tiene sobre la función renal, peroxidación lipídica y síntesis de peróxido de hidrógeno (HO) en glomérulos aislados de ratas tratadas con CyA.

Se utilizaron ratas Wistar macho de 250-275 g de peso. Se administró CyA mediante canulación oral (30 mg/kg/día) durante 30 días. En otro grupo se suplementó el agua de bebida con VitE (α -tocoferol, 0,05 mg/dl) y simultáneamente a la CyA (30 mg/kg/día). Los resultados se compararon con un grupo control y otro tratado exclusivamente con VitE.

Se determinaron malonildialdehído (MDA) en suero y MDA, HO y TXB₂ en glomérulos aislados.

La CyA produjo un deterioro de función renal y paralelamente aumentó la síntesis glomerular de HO, MDA y TXB₂; además, también aumentó el MDA sérico. La VitE no afectó a estos parámetros, pero evitó tanto el deterioro de función renal como el aumento de HO, MDA y TXB₂ glomerular y de MDA sérico originados por la CyA.

En conclusión, la CyA aumenta la síntesis de especies reactivas de oxígeno, peroxidación lipídica y TXB₂ a nivel glomerular. El antioxidante VitE inhibe los efectos de la CyA sobre estos parámetros, sugiriendo un papel de las especies reactivas de oxígeno en la nefrotoxicidad de la droga.

Palabras clave: Ciclosporina A. Vitamina E, α -tocoferol. Agua oxigenada. Malonildialdehído. Tromboxano B₂.

Recibido: 30-X-96.
En versión definitiva: 21-II-97.
Aceptado: 24-II-97.

Correspondencia: Dr. Gabriel de Arriba de la Fuente.
Sección de Nefrología.
Hospital Universitario de Guadalajara.
C/ Donante de Sangre, s/n.
19002 Guadalajara.

VITAMIN E TREATMENT ABOLISHES CYCLOSPORINE A NEPHROTOXICITY

SUMMARY

Reactive oxygen species have been implicated in cyclosporine A (CyA) nephrotoxicity directly or through the activation of the lipid peroxidation process. We have previously demonstrated that CyA increases glomerular synthesis and urinary excretion of tromboxane B₂ (TXB₂) in rats.

Our aim was to analyze the effects of VitE (α -tocoferol) on kidney function, lipid peroxidation and glomerular synthesis of hydrogen peroxide (HPO) in isolated rat kidney glomeruli of rats treated with CyA.

Male Wistar rats weighting 250-275 g were treated with oral CyA (30 mg/kg/day) for 30 days. In another group, rats drank water supplemented with VitE (0.05 mg/dl) and were treated with CyA (30 mg/kg/day). Results were compared with a control group and a group treated only with VitE

We determined malonyldialdehyde (MDA) in serum. Furthermore, in isolated glomeruli we analyzed MDA, HPO (by the peroxidase red phenol method) and TXB₂ (by radioimmunoassay).

CyA induced kidney failure and increased serum MDA. CyA also increased glomerular synthesis of these mediators.

We concluded that CyA caused deterioration in kidney function and increased glomerular synthesis of reactive oxygen species, lipid peroxidation and TXB₂. VitE inhibited these effects suggesting a role of free radicals, probably through the induction of lipid peroxidation and subsequent synthesis of TXB₂, in CyA nephrotoxicity.

Key words: *Cyclosporine A. Vitamin E α -tocoferol. Hydrogen peroxide. Malonyldialdehyde. Tromboxane B₂.*

INTRODUCCION

El principal problema derivado de la terapéutica con ciclosporina A (CyA) es su capacidad nefrotóxica¹⁻⁴. Aunque se ha avanzado mucho en el estudio de sus posibles mecanismos, todavía hoy persisten importantes lagunas de conocimiento respecto a los factores implicados, así como a la utilización de posibles tratamientos preventivos de la misma⁵⁻¹¹.

Hemos demostrado que la CyA es capaz de aumentar tanto la síntesis glomerular como la excreción urinaria de tromboxano (TX) en ratas¹², y se ha postulado que el TX podría contribuir a la nefrotoxicidad aguda de la droga. Sin embargo, no se conocen con claridad los mecanismos por los que la CyA estimula la síntesis de TX.

Por otro lado, los radicales libres han sido implicados en el daño originado por CyA¹³⁻¹⁶. Así, Wang y cols.¹⁶ han demostrado que la utilización de antioxidantes puede evitar la nefrotoxicidad de la CyA en un modelo experimental.

Nuestro objetivo ha sido evaluar el efecto del tratamiento con el antioxidante α -tocoferol sobre la función renal, peroxidación lipídica y síntesis de peróxido de hidrógeno (HO) en glomérulos aislados de ratas tratadas con CyA.

MATERIAL Y METODOS

Animales de experimentación

Se utilizaron ratas Wistar macho de 250-275 g de peso al comienzo de los experimentos criadas y seleccionadas en nuestro animalario. Se mantuvieron a $22 \pm 2^\circ$ C de temperatura y con un ciclo de luz análogo al solar. Los animales utilizados se mantuvieron y manipularon según la normativa europea sobre experimentación y protección animal. Fueron alimentados con dieta de mantenimiento rata-ratón estándar (IMP-R20, Letica, Barcelona), y tanto la dieta como el agua de bebida se suministraron *ad libitum*.

La dosis de CyA se dispensa mediante canulación oral a las 9 de la mañana desde el comienzo del tratamiento hasta el día anterior al sacrificio y la suplementación con el α -tocoferol se incluye en el agua de bebida.

Diseño experimental

Se realizaron cuatro grupos experimentales (con 10 animales por cada uno): control, que fue tratado con el excipiente de la CyA (etanol al 12,6%); VitE, animales a los que se suplementó con vitamina E en el agua de bebida a una dosis de 0,05 mg/dl; CyA, ani-

males tratados con CyA a una dosis de 30 mg/kg/día; VitE + CyA, animales a los que se suplementó en el agua de bebida con VitE (0,05 mg/dl), que además fueron tratados con CyA (a una dosis de 30 mg/kg/día). La duración del experimento fue de 30 días.

Muestras biológicas

Se recoge orina de 24 horas al comienzo y al final de cada experimento. Los animales se sacrifican tras anestesia en campana con éter etílico. La extracción de sangre se realiza por canulación en la bifurcación aorto-femoral, recogiéndose una muestra en tubo con heparina para análisis bioquímico, se centrifuga y el suero se almacena a 4° C hasta el momento de su análisis. Otra muestra se recoge sobre EDTA para la determinación de niveles de CyA.

Tras la exanguinación y muerte del animal se claman las arterias renales y se perfunden los riñones a través de la aorta. De los riñones perfundidos se separa la corteza y por tamizado diferencial se extraen los glomérulos según un método previamente descrito¹⁷.

Los glomérulos obtenidos se resuspenden en 2 ml de Tris-Glucosa (Tris 20 mM, NaCl 130 mM, KCl 5 mM, acetato sódico 10 mM, glucosa 5 mM, pH = 7,4) y se separan 100 µl para la determinación de proteínas. Las muestras para determinación de HO y MDA se procesan inmediatamente. El resto se incuba a 37° C en baño de agua durante 30 min; se centrifuga a 1.500 g durante 5 minutos, se alicuota el sobrenadante y se congela a -80° C para determinación posterior del TXB₂.

Técnicas analíticas

Análisis bioquímico

Las determinaciones séricas y urinarias de creatinina, urea, glucosa e iones se llevaron a cabo en un autoanalizador bioquímico (Dimension AR, Dupont). La concentración de proteínas en glomérulos se determinó mediante el método de Lowry¹⁸. Los niveles de CyA en sangre se determinaron tras dilución (1:10) en tampón fosfato con estabilizador de proteínas; se empleó un «inmunoensayo de polarización por fluorescencia (FPIA)» (TDx Analyzer, Abbott).

Producción de peróxido de hidrógeno (HO)

La determinación se basa en el método de Baud y cols. con ligeras modificaciones para su aplicación a glomérulos¹⁹. Se utiliza una reacción enzimática con una peroxidasa añadida a las muestras. La cuantificación se realiza por detección colorimétrica con el indi-

gador rojo fenol y lectura espectrofotométrica a 610 nm frente a blanco. Los resultados se leen frente a una curva estándar de peróxido de hidrógeno del 30% de riqueza en un intervalo de 0,25 µM a 25 µM.

Medida de «sustancias que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBARS)»

La denominación TBARS engloba a una serie de productos resultantes del proceso de peroxidación lipídica. Reaccionan con el ácido tiobarbitúrico por calentamiento en medio ácido, produciendo un cromóforo rosa correspondiente a cantidades equimoleculares de malonildialdehído (MDA) cuya concentración se determina por lectura espectrofotométrica a 533 nm²⁰. Los TBARS constituyen un índice útil para medir la peroxidación lipídica²¹. El cálculo de las concentraciones se hace frente a una curva de calibración de 1,1,3,3 tetraetoxipropano (Fluka Chemie, Buchs, Switzerland) procesada de la misma manera que las muestras.

Cuantificación de tromboxano B₂ (TXB₂)

La cuantificación de TXA₂ se lleva a cabo por medición de su metabolito estable el TXB₂ inmunorreactivo mediante un RIA¹² con anticuerpos específicos para TX (Sigma Immuno Chemicals). La técnica presenta una recuperación del 93% para el estándar de 62,5 pg/0,1 ml y una sensibilidad de 3 pg/0,1 ml. El coeficiente de variación intraensayo es del 5-10%, y el del interensayo, del 12-15% según niveles.

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 sangre total en el grupo tratado con CyA fueron de 5.773 ± 981 ng/ml y en el grupo tratado con VitE y CyA de 5.470 ± 367 ng/ml, no existiendo diferencias entre ambos.

La ingesta de comida y de agua fue similar y la ganancia de peso tampoco tuvo diferencias entre los grupos, aunque en las ratas tratadas con CyA ésta fue discretamente menor.

Tampoco existieron diferencias entre la ingesta de agua en los animales de los cuatro grupos experimentales (tabla I).

Tabla I. Aumento de peso corporal y valores de ingesta.

	Control	Vit. E	CyA	Vit. E + CyA
Incremento de peso (g/día)	5,4 ± 0,5	5,9 ± 1,1	3,7 ± 1,4	5,6 ± 1,5
Ingesta de comida (g/día)	22,5 ± 1,1	18,9 ± 0,6	20,4 ± 1,8	17,9 ± 1,4
Ingesta de agua (ml/día)	41,6 ± 4,5	38,0 ± 4,0	41,2 ± 4,5	37,1 ± 2,1

La CyA provocó un deterioro de función renal, manifestado por un aumento de la creatinina y urea séricas, con descenso del aclaramiento de creatinina. Además, indujo un aumento de la glucemia y de las cifras de potasio sérico. Finalmente, descendió de modo significativo la osmolaridad urinaria. El tratamiento con VitE no modificó ninguno de los parámetros anteriores en relación al grupo control. Por otro lado, la VitE evitó el deterioro de la función renal, así como el aumento de glucemia y del potasio sérico inducidos por la CyA, aunque no fue capaz de neutralizar los efectos de la CyA sobre la osmolaridad urinaria (tabla II).

Tabla II. Parámetros analíticos séricos y urinarios.

	Control	Vit. E	CyA	Vit. E + CyA
Suero				
Crea (mg/dl)	0,54 ± 0,02	0,56 ± 0,03	0,80 ± 0,04*	0,60 ± 0,00
Urea (mg/dl)	26,8 ± 3,6	27,8 ± 1,7	35,5 ± 3,3*	31,5 ± 1,8
CCrea (ml/min 100 g)	0,56 ± 0,12	0,48 ± 0,08	0,30 ± 0,04*	0,50 ± 0,10
Na (mmol/l)	139,6 ± 1,4	140,6 ± 0,7	136,3 ± 1,8	140,5 ± 1,2
K (mmol/l)	4,4 ± 0,1	4,3 ± 0,1	5,1 ± 0,3*	4,5 ± 0,2
Gluc (mg/dl)	175,6 ± 12,6	192,6 ± 8,2	291,8 ± 20,8*	214,0 ± 26,3
Orina				
Exc. Na (μmol/min)	0,35 ± 0,02	0,36 ± 0,05	0,20 ± 0,02*	0,20 ± 0,02*
Exc. crea (mg/24 horas)	11,4 ± 2,2	14,6 ± 1,2	11,4 ± 0,8	9,4 ± 0,8
Osmol. (mOsmol/kg) ..	1.627 ± 335	1.953 ± 351	1.178 ± 102*	894 ± 150*

p < 0,05 vs. control

Tras tratamiento con CyA se observó un aumento de la producción de HO glomerular en relación a las ratas controles o tratadas exclusivamente con VitE. En ratas tratadas simultáneamente con CyA y VitE no se modificó la síntesis de HO glomerular (figura 1).

La CyA provocó un aumento del MDA sérico y glomerular, a diferencia de lo que sucedió en ratas controles y en las tratadas con VitE. Por otro lado, el tratamiento con VitE evitó el aumento de MDA inducido por CyA en suero y en glomérulos aislados (figs. 2 y 3).

Finalmente, la VitE evitó también el aumento de la síntesis glomerular de TXB₂ que había inducido la CyA (fig. 4).

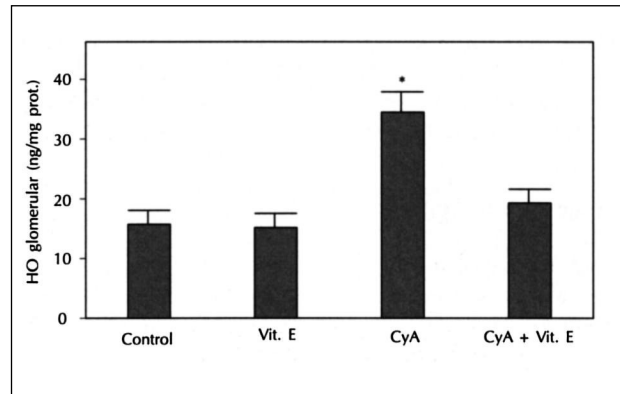


Fig. 1.—Síntesis glomerular de agua oxigenada (HO). p < 0,05 vs control.

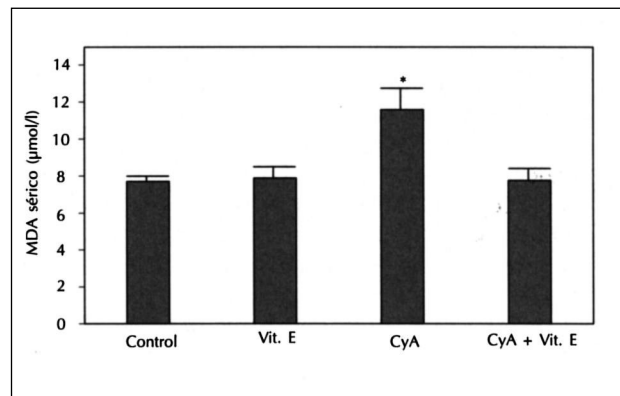


Fig. 2.—Malonildialdehído sérico (MDA), medido como sustancias que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBARS). p < 0,05 vs control.

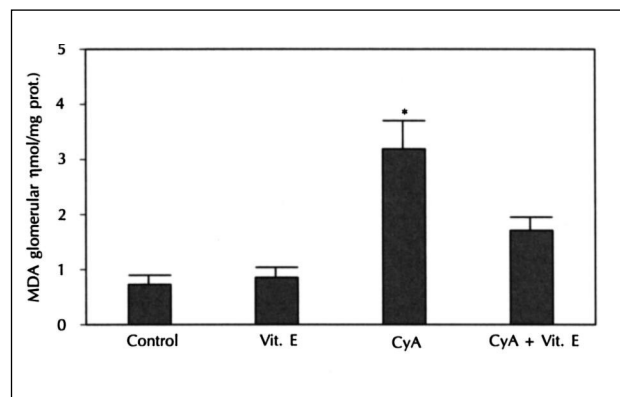


Fig. 3.—Malonildialdehído glomerular (MDA), medido como sustancias que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBARS). p < 0,05 vs control.

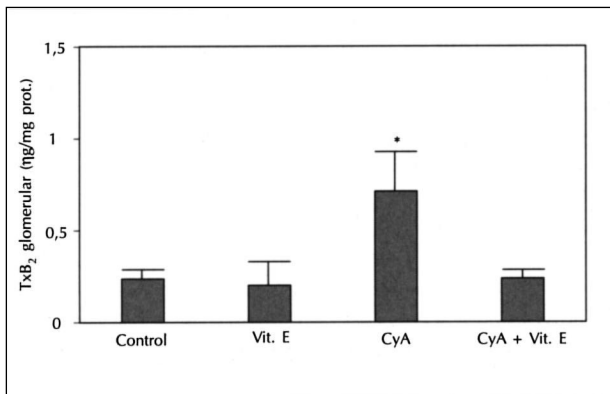


Fig. 4.—Tromboxano B₂ glomerular. $p < 0,05$ vs control.

DISCUSION

Como hemos demostrado previamente¹², la CyA es capaz de aumentar de un modo dependiente del tiempo y de la dosis utilizada la síntesis glomerular y la excreción urinaria de TXB₂. En nuestro estudio se planteó la hipótesis de que este aumento podría estar relacionado con la formación de especies reactivas de oxígeno y posterior peroxidación lipídica.

El α -tocoferol se administró por vía oral por varias razones. En primer lugar, se comprobó mediante nefelometría que a las dosis utilizadas se disuelve adecuadamente en agua y no forma emulsiones. Por otro lado, es una vía cómoda, con la que se evita la administración de dosis elevadas de forma puntual. Se utilizaron concentraciones altas de VitE para garantizar la suplementación de una cantidad suficiente; además, teniendo en cuenta que en la ingesta hídrica no hay diferencias entre unos grupos y otros, la dosis fue similar en todos los experimentos. Por otro lado, la VitE no interfirió en la absorción de la CyA, ya que sus niveles sanguíneos fueron similares en los animales tratados exclusivamente con CyA o los tratados con ésta y el antioxidante.

LA VitE no tuvo efectos sobre los parámetros analíticos estudiados; sin embargo, fue capaz de neutralizar el efecto deletéreo de la CyA sobre la función renal. Estos hallazgos sugieren que el deterioro de función renal inducido por CyA podría estar mediado por la síntesis de radicales libres. En el estudio de Wang y cols.¹⁶ en ratas uninefrectomizadas y tratadas con CyA (12,5-25 mg/kg/día durante 4-8 semanas) se demuestra también que la ViE mejoró el aclaramiento de creatinina, flujo sanguíneo, resistencia vascular y grado de fibrosis renal inducido por la CyA. Este efecto fue paralelo al descenso producido en el grado de peroxidación lipídica a nivel renal y urinario que había aumentado el tratamien-

to con CyA. Nosotros demostramos que la VitE neutralizó también el aumento de MDA en suero y glomerulos aislados, sugiriendo que los efectos de la CyA podrían estar mediados por la peroxidación de los lípidos de membrana.

El tratamiento con CyA también produjo otras alteraciones electrolíticas, como hiperglucemia e hipercaliemia. Se ha postulado que la hiperglucemia podría derivarse de la toxicidad directa de la droga sobre los islotes pancreáticos o de resistencia a la acción periférica de la insulina secundaria a insuficiencia renal o a los trastornos electrolíticos condicionados por el fármaco, aunque otros autores proponen una alteración en la síntesis de glucógeno a nivel hepático²². Nuestros datos sugieren que el efecto de la CyA sobre la glucemia podría estar relacionado con la síntesis de radicales libres y ulterior peroxidación lipídica, ya que fue inhibido por la VitE.

El mecanismo de la hipercaliemia provocada por la CyA parece ser multifactorial y a su génesis contribuyen el deterioro de función renal, un probable efecto tóxico directo sobre el túbulo y un efecto a nivel suprarrenal con disminución de la síntesis de aldosterona²³⁻²⁵. Nuestros resultados sugieren que al menos alguno de estos efectos están mediados por la síntesis de radicales libres y peroxidación de lípidos de membrana, ya que el tratamiento con VitE evita la hipercaliemia provocada por la CyA. No obstante, no se puede descartar el papel que podría tener la insuficiencia renal provocada por la CyA en el potasio sérico, ya que el tratamiento con VitE también evitó el desarrollo de insuficiencia renal.

Finalmente, el tratamiento con VitE no modificó la osmolaridad urinaria de los animales tratados simultáneamente con CyA, hecho que sugiere que la toxicidad de la CyA a nivel tubular está mediada por mecanismos diferentes a la producción de radicales libres.

La CyA produjo un aumento de la síntesis glomerular de HO. Se sabe que la CyA es capaz de aumentar la producción de anión superóxido en células endoteliales²⁶, y en nuestro laboratorio existen datos que confirman que las células mesangiales cultivadas aumentan la producción de especies reactivas de oxígeno en respuesta a la CyA²⁷. La mayor parte del HO generada en la corteza renal proviene de la dismutación del anión superóxido, por efecto del enzima superóxido dismutasa²⁸, y es posible que la CyA produzca un aumento del mismo. De hecho, se ha especulado que el metabolismo de la CyA a través de la superfamilia de enzimas del citocromo P-450 podría aumentar la liberación de especies reactivas de oxígeno y, más concretamente, de anión superóxido²⁹. El tratamiento con VitE elimina el efecto de la CyA sobre la síntesis glomerular de HO, sugiriendo que la VitE puede eliminar especies reactivas

vas de oxígeno como el anión superóxido y así evitar la formación de HO a nivel glomerular.

El MDA, aunque es un índice grosero, es un marcador de peroxidación lipídica. Observamos un aumento en suero y glomérulos aislados de ratas tratadas con CyA, que fue abolido por el tratamiento con VitE. Se ha demostrado que la CyA puede aumentar la producción de MDA en microsomas hepáticos y renales de rata y humanos³⁰. Además, este efecto puede bloquearse por glutatión, superóxido dismutasa y catalasa³¹, sugiriendo que la CyA produce peroxidación lipídica a través de la síntesis de especies reactivas de oxígeno como el anión superóxido y el peróxido de hidrógeno. La VitE no modificó el MDA sérico y glomerular, pero evitó el aumento de MDA provocado por la CyA. Estos datos sugieren que la VitE, comportándose como «scavenger» de radicales libres, elimina el efecto de inducción de peroxidación lipídica provocado por la CyA.

Numerosos estudios han demostrado el papel del TX en la nefrotoxicidad inducida por la CyA utilizando antagonistas de la TX sintetasa o del receptor del TX³²⁻³⁷. El tratamiento con VitE evitó el aumento de TX glomerular inducido por CyA. Se sabe, aunque no se conoce el mecanismo en profundidad, que un aumento en la síntesis de radicales libres puede producir aumento en la producción de metabolitos del ácido araquidónico, junto a otros productos de peroxidación, como el F2-isoprostano¹⁶. Nuestros resultados sugieren que el efecto protector de la VitE sobre la nefrotoxicidad inducida por la CyA podría estar relacionado con su capacidad para eliminar los radicales libres que serían los inductores del aumento del TX, posiblemente a través de peroxidación de lípidos de membrana.

En conclusión, nuestros resultados apoyan que la nefrotoxicidad de la CyA podría estar mediada por la formación de radicales libres que inducen peroxidación lipídica y daño renal bien de modo directo o bien a través de la síntesis de mediadores como el TX. No conocemos si el tratamiento con antioxidantes exógenos podría influir en los efectos inmunosupresores de la CyA, pero sería de gran utilidad la realización de estudios encaminados a estudiar esta hipótesis. A la luz de estos resultados, el tratamiento simultáneo con antioxidantes como la VitE podría tener utilidad clínica en la prevención de la nefrotoxicidad y otros efectos secundarios del tratamiento con CyA.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por la beca FIS 93/19. T. Parra Cid fue becario (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.

El presente trabajo recibió un accésit en Investigación Básica de la Fundación Renal Iñigo Alvarez de Toledo (convocatoria de 1996). Sus resultados han sido comunicados en el Congreso Nacional de Nefrología de la SEN en Salamanca (1996) y en el Congreso Americano de Nefrología en Nueva Orleans (1996).

BIBLIOGRAFIA

1. Robert M, Graham MD: Cyclosporine: mechanisms of action and toxicity. *Cleve Clin J Med* 61: 308-313, 1994.
2. Chapman JR, Griffiths D, Harding NGL, Morris PJ: Reversibility of Cyclosporin nephrotoxicity after three months treatment. *Lancet* 1: 128-130, 1985.
3. Barros EJC, Boim MA, Ajzen H, Ramos OL, Schor N: Glomerular hemodynamics and hormonal participation on cyclosporin nephrotoxicity. *Kidney Int* 32: 19-25, 1987.
4. Myers BD: What is cyclosporin nephrotoxicity? *Transplant Proc* 21: 1430-1432, 1987.
5. Gerkens JF, Smith AJ: Effects of captopril and theophylline treatment on cyclosporine-induced nephrotoxicity in rats. *Transplantation* 40: 213-214, 1985.
6. Kon V: Cyclosporin causes endothelin-dependent acute renal failure. *Kidney Int* 37: 486-492, 1990.
7. Cairns HS, Fairbanks LD, Westwick J, Neil GH: Cyclosporin therapy in vivo attenuates the response to vasodilators in the isolated perfused rabbit kidney. *Br J Pharmacol* 98: 463-468, 1989.
8. Lamas S, Olivera A, López-Novoa JM, López-Farré A, Hernandez L: Effect of BN 52021 on cyclosporine-induced glomerular function impairment. En: Braquet P, editor. *Ginkgo - lides: chemistry, biology, pharmacology and clinical perspectives*. Barcelona: JR Prous, 2: 547-559, 1990.
9. Dos Santos OF, Boim MA, Barros EJ, Pirotzky E, Braquet P, Schor N: Nephrotoxicity of cyclosporine: the role of platelet-activating factor and thromboxane. *Lipids* 26: 1320-1323, 1991.
10. Paller MS: Effects of prostaglandin E₁ analogue misoprostol of cyclosporin nephrotoxicity. *Transplantation* 45: 1126-1131, 1988.
11. Coffman TM, Ruiz P, Sanfilippo F: Chronic thromboxane inhibition preserves function of rejecting rat renal allografts. *Kidney Int* 35: 24-30, 1989.
12. Parra T, Arriba G, Pérez de Lema G, Arribas I, Martín-Carballido S, Rodríguez-Puyol M, Rodríguez-Puyol D: La ciclosporina A aumenta la síntesis glomerular y la excreción urinaria de tromboxano en ratas. *Nefrología* 126: 220-227, 1996.
13. Yoshimura R, Yoshimura N, Nakatanis T: The effect of cyclosporine on renal microsomal cytochrome P-450 systems. *Clin Nephrol* 40: 339-345, 1993.
14. Walker RJ, Lazzaro VA, Duggin GG, Horvath JS, Tiller DJ: Evidence that alterations in renal metabolism and lipid peroxidation may contribute to cyclosporine nephrotoxicity. *Transplantation* 50: 487-492, 1990.
15. Duruibe VA, Okonmah A, Blyden GT: Effect of cyclosporine on rat liver and kidney glutathione content. *Pharmacology* 39: 205-212, 1989.

16. Wang C, Salahudeen AK: Lipid peroxidation accompanies cyclosporine nephrotoxicity: effects of vitamin E. *Kidney Int* 7: 927-934, 1995.
17. Misra RP: Isolation of glomeruli from mammalian kidneys by graded sieving. *Am J Clin Pathol* 58: 135-139, 1972.
18. Lowry OH, Rosebrugh NG, Farr AL, Randall LJ: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-269, 1951.
19. Baud L, Pérez J, Ardaillou R: Dexamethasone and hydrogen peroxide production by mesangial cells during phagocytosis. *Am J Physiol* 250: F596-F604, 1986.
20. Yagi K. En: Yagi K, editor. *Lipid peroxides in biology and medicine. Assay for serum lipid peroxide level and its clinical significance*. Academic Press 1980.
21. Satoh K: Serum lipid peroxide in cerebrovascular disorders determined by a new colorimetric method. *Clin Chim Acta* 90: 37-43, 1978.
22. Betschart JM, Virji MA, Shinozuka H: Cyclosporine A-induced alterations in rat hepatic glycogen metabolism. *Transplant Proc* 20 (Suppl. 3): 880-884, 1988.
23. Thiel G: Experimental cyclosporine A nephrotoxicity: a summary of the international workshop. *Clin Nephrol* 25: S205-S210, 1986.
24. Mason J: The pathophysiology of Sanimmune (Cyclosporine) in man and animals. *Pediatr Nephrol* 4: 554-574, 1990.
25. Cairns HS, Neild G: Cyclosporin nephrotoxicity. En: Cameron S, Davison AM, Grünfeld JP, Kerr D, Ritz E, editores: *Oxford textbood of clinical nephrology*. Oxford: Oxford University Press 1560-1569, 1990.
26. Diederich D, Skopec J, Diederich A, Dai FX: Cyclosporine produces endothelial dysfunction by increased production of superoxide. *Hypertension* 23 (6 Pt 2): 957-961, 1994.
27. Pérez de Lema G, Parra T, Arriba G, Torrecillas G, Iglesias C, Arribas I: Reactive oxygen species mediates the effects of cyclosporine A on human cultured mesangial cells [Abstract]. *Book of Abstracts XVI International Congress of the Transplantation Society*. Barcelona, 469, 1996.
28. Shah SV, Walker PD, Ueda N, Nath KA. En: Harvey C. Gonick, editor: *Current Nephrology. Reactive oxygen metabolites in toxic acute renal failure*. St. Louis: Mosby 18: 75-98, 1995.
29. Wang C, Salahudeen AK: Cyclosporine nephrotoxicity: attenuation by an antioxidant-inhibitor of lipid peroxidation in vitro and in vivo. *Transplantation* 58: 940-946, 1994.
30. Walker RJ, Lazzaro VA, Duggin GG, Horvath JS, Tiller DJ: Evidence that alterations in renal metabolism and lipid peroxidation may contribute to cyclosporine nephrotoxicity. *Transplantation* 50: 487-492, 1990.
31. Ahmed SS, Strobel HW, Napoli KL, Grevel J: Adrenochrome reaction implicates oxygen radicals in metabolism of cyclosporine A an FK-506 in rat and human liver microsomes. *J Pharmacol Exp Ther* 265: 1047-1054, 1993.
32. Smeesters C, Chaland P, Giroux L, Moutquin JM, Etienne P, Douglas F, Corman J, St-Louis G, Daloz P: Prevention of acute cyclosporine A nephrotoxicity by a thromboxane synthetase inhibitor. *Transplant Proc* 20 (Supl. 3): 658-664, 1988.
33. Gladue RP, Newborg MF: The protective effects of thromboxane synthetase inhibitor Dazmegrel on nephrotoxicity in cyclosporine-treated rats. *Transplantation* 52: 837-841, 1991.
34. Smith SR, Creech EA, Schaffer AV, Martin LL, Rakhit A, Douglas FL, Klotman PE, Coffman TM: Effects of thromboxane synthase inhibition with CGS 13080 in human cyclosporine nephrotoxicity. *Kidney Int* 41: 199-205, 1992.
35. Grieve EM: The reversal of experimental CyA nephrotoxicity by thromboxane synthetase inhibition. *Biochem Pharmacol* 45: 1351-1354, 1993.
36. Perico N, Rossini M, Imberti O, Malanchini B, Cornejo RP, Gaspari F, Bertani T, Remuzzi G: Thromboxane receptor blockade attenuates chronic cyclosporin nephrotoxicity and improves survival in rats with renal isograft. *J Am Soc Nephrol* 2: 1398-1404, 1992.
37. Bunke M, Wilder L, Martin A: Protection of glomerular filtration rate by thromboxane receptor antagonist L655,240 during low dose cyclosporin administration. *Prostaglandins* 43: 351-360, 1992.