

03068³
2oje.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS
UNIDAD ACADEMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL
Y DE POSGRADO DEL C. C. H.**

**PARTICIPACION DEL OXIDO NITRICO EN LAS ALTERACIONES
EN LA HEMODINAMICA GLOMERULAR INDUCIDAS POR LA
NEFROTOXICIDAD CRONICA POR CICLOSPORINA A EN RATAS
UNINEFRECTOMIZADAS.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN
CIENCIAS FISIOLÓGICAS
P R E S E N T A :
NORMA ARACELI BOBADILLA SANDOVAL**

MEXICO, D. F.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

1994



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**PARTICIPACION DEL OXIDO NITRICO EN LAS ALTERACIONES EN
LA HEMODINAMICA GLOMERULAR INDUCIDAS POR LA
NEFROTOXICIDAD CRONICA POR CICLOSPORINA A EN RATAS
UNINEFRECTOMIZADAS.**

T E S I S

**QUE PRESENTA: Norma Araceli Bobadilla Sandoval PARA OBTENER EL -
GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS FISIOLÓGICAS.**

**Esta tesis se realizó en el Departamento de Nefrología del Instituto
Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez" bajo la dirección del Dr. Jaime
Herrera Acosta.**

COASESORES:

Dra. Martha Franco Guevara y Dr. José Pedraza Chaverri

Al Dr. Jaime Herrera Acosta le agradezco:

Su disposición para transmitirme parte de su gran conocimiento.

Sus sabios consejos y constante motivación.

Su confianza y apoyo en mi superación académica.

Y el orientar mis pasos en el difícil sendero de la investigación.

**Mi agradecimiento a la Dra. Martha Franco
y al Dr. José Pedraza quienes enriquecieron
esta tesis con sus valiosos comentarios
durante su realización.**

**Al Dr. Ricardo Correa
y al Dr. Ramón Paniagua
les agradezco el dedicarme
parte de su valioso tiempo
y sus acertados comentarios.**

A mis compañeros y amigos:

Dra. Edilia Tapia

Dra. Martha Franco

Pte. de Biol. Pedro López

Pte. de QFB. Sandra Mendoza

Dr. Romeo García Torres

Tec. Juan Alfredo Alvarado

que con su gran apoyo y entusiasta colaboración hicieron posible la culminación de este trabajo y la realización de una mas de las metas de mi vida.

A MIS HIJAS

Yvette y Andrea

A MI ESPOSO

Albert

A MIS PADRES Y HERMANOS

Miguel Bobadilla y Ofelia Sandoval

Irma, Ofelia, Leticia, Miguel, Edgar

y Omar..

INDICE

	RESUMEN	VII
I)	GLOSARIO	VIII
II)	INTRODUCCION	1
III)	HIPOTESIS	8
IV)	OBJETIVOS	9
V)	MATERIAL Y METODOS:	10
	Producción del Modelo Experimental	10
	Protocolos Experimentales	10
	Estudios de Micropunción	11
	Microanálisis y Metodos Analíticos	14
	Cálculos	15
	Análisis Estadístico	17
VI	RESULTADOS:	18
a)	Nefrotoxicidad por ciclosporina	18
b)	Efecto de la inhibición de la síntesis de óxido nítrico	24
c)	Efecto de la estimulación de la síntesis de óxido nítrico	29
VII	RESUMEN DE RESULTADOS	34
VIII	DISCUSION	37
IX	CONCLUSIONES	42
X	BIBLIOGRAFIA	43

RESUMEN.

La ciclosporina es un medicamento inmunosupresor que ha mejorado la supervivencia de los pacientes trasplantados, pero, su uso se encuentra restringido debido a su efecto nefrotóxico que se caracteriza por vasoconstricción renal. El mecanismo por el cual la ciclosporina produce vasoconstricción no se ha establecido. El endotelio regula el tono vascular a través de la liberación de factores vasorelajantes como el óxido nítrico y la prostaciclina y factores vasoconstrictores como la endotelina. La ciclosporina produce daño endotelial y se ha sugerido que la vasoconstricción sea causada por un desequilibrio en la liberación de estos factores e incluso se ha postulado que sea el resultado de una producción insuficiente de óxido nítrico.

Con el propósito de evaluar esta hipótesis se estudió en ratas con nefrotoxicidad por ciclosporina la respuesta hemodinámica glomerular a la inhibición y a la estimulación de la síntesis de óxido nítrico, mediante el uso de un inhibidor específico (nitro metil éster de arginina) y un precursor (L-arginina). Así mismo, se determinó la excreción urinaria de $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ los cuales son los metabolitos estables de la síntesis de óxido nítrico.

La administración crónica de ciclosporina produjo vasoconstricción renal, sin embargo, la excreción urinaria de $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ fue similar al control. La inhibición del óxido nítrico produjo vasoconstricción y la estimulación con arginina produjo vasodilatación renal, ambas respuestas fueron similares a las del grupo control.

En la nefrotoxicidad por ciclosporina la producción de óxido nítrico es normal y por lo tanto, la vasoconstricción observada no es el resultado de una deficiencia de óxido nítrico. Mas aún nuestros resultados indican que en la nefrotoxicidad por ciclosporina el óxido nítrico participa en mantener la función renal y que la capacidad para sintetizarlo se encuentra conservada.

GLOSARIO:

Arg	Arginina
CA	Concentración de Proteínas en la Arteria Femoral
CE	Concentración de Proteínas en la Arteriola Eferente
CyA	Ciclosporina
FG	Filtración Glomerular Total
FG/n	Filtración Glomerular por Nefrona.
FP/n	Flujo Plasmático Glomerular.
FENa	Fracción Excretada de Sodio.
FF/n	Fracción de Filtración por nefrona
Htc	Hematocrito.
Kf	Coefficiente de Ultrafiltración.
NAME	Nitro metil ester de Arginina
PIA	Presión Oncótica Aferente.
PIE	Presión Oncótica Eferente.
ON	Oxido Nítrico
PC	Peso Corporal
PCG	Presión Capilar Glomerular.
PR	Peso Renal.
RA	Resistencia Aferente.
RE	Resistencia Eferente.
RPA	Reabsorción Proximal Absoluta.
TAM	Tensión Arterial Media.
UNaV	Excreción Urinaria de Sodio.

INTRODUCCION

La ciclosporina es un medicamento inmunosupresor aislado del hongo *Tolipocladium polysporum*; su actividad inmunosupresora es mediada por inhibición de la producción de interleukina 2 por las células T, la cual es un factor esencial para el crecimiento y la proliferación de las células B y células T citotóxicas (1,2).

En el trasplante de órganos, principalmente de corazón y riñón, el uso de la ciclosporina ha mejorado en forma notable la sobrevivencia de los pacientes trasplantados; aunque su uso se encuentra limitado por sus efectos adversos como acidosis metabólica, hipertensión, hiperkalemia, hepatotoxicidad y nefrotoxicidad, siendo esta última la más frecuente y relevante desde el punto de vista clínico.

La nefrotoxicidad causada por la ciclosporina se caracteriza por vasoconstricción renal, que se traduce en disminución del flujo plasmático glomerular y en consecuencia de la función renal (3-6). Se han descrito dos formas de nefrotoxicidad: la forma aguda y la forma crónica. La primera se caracteriza por reducción del flujo plasmático glomerular y de la filtración glomerular, esta forma es reversible si se suspende el tratamiento o se reduce la dosis utilizada, sin embargo esto puede precipitar el rechazo del injerto (6); la segunda se caracteriza por deterioro gradual de la función renal y alteraciones histológicas irreversibles (4,5). En estudios histopatológicos de pacientes trasplantados con tratamiento crónico se han descrito alteraciones de la pared vascular, trombosis, fibrosis túbulo-intersticial y esclerosis glomerular; así como aumento en el número de vacuolas del epitelio tubular (4,5).

English y col. (7) estudiaron la histopatología en ratas tratadas con ciclosporina y encontraron que el diámetro de las arteriolas estaba disminuido comparado con el grupo control; sin embargo, no observaron alteraciones

tubulares: estos autores concluyen que la vasoconstricción arteriolar aferente fue el principal factor patogénico en la nefrotoxicidad por ciclosporina.

En modelos experimentales, donde se ha estudiado la hemodinámica glomerular por medio de micropunción renal, se ha encontrado que la ciclosporina administrada tanto en forma aguda como crónica, produce reducción de la filtración glomerular por nefrona, por vasoconstricción renal intensa con incremento en las resistencias arteriolas aferente y eferente, lo que produce disminución del flujo plasmático por nefrona (8-11); además en algunos estudios se ha observado disminución del coeficiente de ultrafiltración (Kf) (8,9).

Se han propuesto distintos mediadores para explicar la vasoconstricción renal inducida por ciclosporina tales como angiotensina II (12-15), el tromboxano A₂ (16) y recientemente a la endotelina (17-19), sin embargo su participación no se ha establecido claramente.

Perico y col. (14) estudiaron la contribución del sistema renina angiotensina durante la administración crónica de ciclosporina y observaron un aumento en la actividad de renina plasmática. Tuffro y col. (13) encontraron que la ciclosporina incrementa los niveles de renina intrarrenales, altera la distribución de renina intrarrenal y sugieren que puede estimular la síntesis de renina. Sin embargo, en modelos con nefrotoxicidad aguda por ciclosporina, donde se evaluó el papel de los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, los resultados son contradictorios, en uno de ellos (8), se encontró una recuperación parcial de la filtración glomerular por nefrona y en el otro (15) no se observó ningún efecto sobre la hemodinámica glomerular.

En estudios en los que se administró ciclosporina a ratas por periodos prolongados (5 meses), se produjo un aumento en la síntesis de tromboxanos y la administración de un inhibidor de la sintetasa de tromboxanos, UK-38485,

restableció parcialmente la filtración glomerular por nefrona, pero no modificó el flujo plasmático glomerular, indicando la participación de otros factores además del tromboxano A₂ (14).

Por otra parte, se ha demostrado que el endotelio vascular juega un papel importante en la regulación de la presión arterial y del flujo sanguíneo, ya que libera sustancias vasoactivas como el óxido nítrico y la endotelina que modulan la tonicidad de los vasos (20). La endotelina es un potente péptido vasoconstrictor de 23 aminoácidos, formado por la acción de una endopetidasa denominada enzima convertidora de endotelina; la vasoconstricción que induce es 10 veces más acentuada en el riñón que en cualquier otro lecho vascular y es 10 veces más potente que la angiotensina II (21). La infusión exógena de endotelina en ratas, produce hipertensión sistémica, vasoconstricción renal, disminución del coeficiente de ultrafiltración y de la filtración glomerular por nefrona (22), es decir, efectos similares a los producidos por la administración aguda de ciclosporina.

En estudios con cultivos de células endoteliales encontraron que la ciclosporina inhibe el crecimiento y proliferación celular (23,24). Kon y col. (17) han observado que la infusión aguda de ciclosporina aumenta la producción de endotelina aunque 60 minutos después los niveles circulantes de endotelina regresan a valores normales, lo cual aumenta el número de receptores renales de endotelina (25). Por otra parte, se ha demostrado que la velocidad de disociación entre la endotelina y su receptor es muy baja e incluso puede ser irreversible, lo que explica el efecto vasoconstrictor tan prolongado a pesar de que los niveles circulantes sean normales (26). En animales con tratamiento agudo de ciclosporina, la infusión intrarrenal de anticuerpos anti-endotelina o del antagonista de los receptores restableció la filtración glomerular por nefrona

y el flujo plasmático glomerular, sugiriendo que la endotelina es responsable de la vasoconstricción observada (17-19).

Por otra parte el endotelio libera las sustancias vasorelajantes prostaciclina y el factor vasorelajante derivado del endotelio. Palmer y col. (27) e Ignarro y col. (28) establecieron la identidad farmacológica y química del factor vasorelajante derivado del endotelio como óxido nítrico.

El óxido nítrico es sintetizado a partir de L-arginina mediante la acción de una sintasa que divide los grupos guanidino terminales de este aminoácido, dando como coproducto la L-citrulina. Actualmente se conocen dos sintetas de óxido nítrico, una de ellas es constitutiva y dependiente de calcio, calmodulina, y NADPH (29-31). Esta forma de enzima está presente en las células endoteliales (32), en el sistema nervioso central (33,34) y en el epitelio tubular (35). La otra forma es "inducible" la cual es independiente de calcio y requiere de tetrahidrobiopterina para la oxidación enzimática del nitrógeno guanidínico de la L-arginina (36,37). Se ha encontrado en macrófagos, en células del parénquima hepático, adenocarcinoma y pulmón (38); y se activa por lipopolisacáridos en cultivos de células mesangiales (39). En el organismo el óxido nítrico tiene propiedades antisépticas que se deben a la enzima inducible de los macrófagos, la cual tiene actividad citotóxica contra bacterias, hongos, protozoarios y células tumorales (40-42). Recientemente se ha demostrado que las células endoteliales vasculares poseen ambos tipos de enzimas (40) .

El óxido nítrico es muy liposoluble y difunde rápidamente hasta las células del músculo liso vascular donde tiene una gran afinidad por el grupo hemo de la guanilato ciclasa soluble, la cual genera GMPc a partir de GTP y este a su vez activa una proteína cinasa que produce desfosforilación de las cadenas ligeras de miosina, dando como resultado la relajación del músculo liso vascular.

Generalmente la concentración intracelular de arginina es alta, por lo que ésta no es un factor limitante en la velocidad de reacción para la síntesis de óxido nítrico. En condiciones fisiológicas la liberación de óxido nítrico y su vida media están reguladas tanto por un inhibidor del óxido nítrico como por moléculas que evitan la degradación de este factor. El inhibidor de la síntesis de óxido nítrico recientemente fue aislado del suero humano y consiste de dos grupos metilo enlazados al átomo de nitrógeno del grupo guanidino de la L-arginina y se conoce como N^G,-N^G,-dimetil arginina (43). Por otra parte el óxido nítrico es degradado rápidamente a nitritos y nitratos, sin embargo, la vida media de éste factor se puede prolongar por la presencia de "moléculas protectoras", entre las más importantes se encuentran los grupos S-nitrosotiol de los aminoácidos, péptidos y proteínas. El óxido nítrico reacciona con el grupo libre tiol de las proteínas para formar un compuesto óxido nítrico-nitroso-S-proteína con bioactividad comparable con la del óxido nítrico, pero con una vida media de horas (44).

Actualmente no es factible medir directamente el óxido nítrico en la sangre dado que su vida media es de segundos y muchas sustancias incluyendo la hemoglobina interfieren con su determinación, sin embargo, es posible cuantificar sus metabolitos estables como lo son los nitritos y nitratos (NO₂/NO₃⁻) por lo tanto la excreción urinaria de NO₂/NO₃⁻ estima indirectamente la generación local renal y sistémica del óxido nítrico

El óxido nítrico es un importante modulador del tono vascular sistémico, ya que la inhibición de su síntesis produce aumento de la presión arterial y de el flujo sanguíneo (45,46). De este modo la síntesis de óxido nítrico a partir de L-arginina tiene una función reguladora a nivel vascular que si se modifica puede dar alteraciones importantes tanto a nivel sistémico como a nivel renal; incluso se ha postulado que el manejo selectivo de la síntesis de óxido nítrico pueda

utilizarse para la prevención y tratamiento de algunas enfermedades (47) como hipertensión, aterosclerosis y diabetes (48).

Experimentalmente es posible evaluar la contribución del óxido nítrico en lechos vasculares mediante la administración de inhibidores específicos, como el nitro metil ester de arginina (NAME) y el mono metil L nitro arginina (LNMMMA) los cuales son análogos competitivos de la L-arginina y se han utilizado para evaluar el papel del óxido nítrico en el control de la presión arterial, la regulación del flujo sanguíneo y la regulación de la hemodinámica glomerular (20,41,42). Además, se ha demostrado que el NAME posee una potencia significativamente mayor que el LNMMMA (52). Se ha observado que la administración de estos inhibidores produce hipertensión arterial tanto en animales anestesiados como conscientes; en ambos casos el efecto es revertido por un exceso de L-arginina, mas no por D-arginina lo que demuestra la especificidad de la sintasa por el sustrato (49-51). Experimentalmente también es posible evaluar la capacidad del endotelio vascular renal para producir óxido nítrico mediante el uso L-arginina que estimula la síntesis de este factor produciendo vasodilatación (53).

Se ha propuesto que la vasoconstricción renal asociada a ciclosporina puede deberse a un desequilibrio en la liberación de sustancias vasorelajantes y vasoconstrictoras. Esta alteración puede ser el resultado de: 1) aumento en la producción de factores contráctiles, 2) disminución en la liberación de factores vasorelajantes 3) liberación normal de factores vasorelajantes pero insuficiente para contrarrestar el efecto de las sustancias vasoconstrictoras.

Hasta ahora no se ha investigado la contribución del óxido nítrico sobre la hemodinámica glomerular en la nefrotoxicidad por ciclosporina, por lo que, el presente estudio fue diseñado para evaluar tanto la producción basal como la

capacidad del endotelio para producir óxido nítrico mediante la administración de NAME y L-arginina en ratas con nefrotoxicidad por ciclosporina.

HIPOTESIS

El endotelio produce y libera sustancias vasoactivas que afectan la tonicidad del músculo liso vascular. Las alteraciones en la liberación de factores contráctiles y relajantes derivados del endotelio tanto en condiciones fisiológicas como en enfermedades renales, pueden influir de forma importante en la función y hemodinámica renal.

La nefrotoxicidad producida por ciclosporina, se caracteriza por vasoconstricción renal intensa, la cual se ha atribuido a una alteración en la liberación de factores contráctiles y vasorelajantes producidos por el endotelio. Se ha postulado que éste desequilibrio pueda ser el resultado de un aumento en la síntesis de factores vasoconstrictores, y/o una disminución en la liberación factores vasorelajantes como el óxido nítrico.

1) Si la administración de NAME, inhibidor de la síntesis de óxido nítrico, acentúa la vasoconstricción renal preexistente en ratas con nefrotoxicidad por ciclosporina y la respuesta es mayor que en los controles, esto indicará que la producción renal de óxido nítrico es normal o está aumentada y contribuye a mantener la filtración glomerular y a contrarrestar el efecto vasoconstrictor de la ciclosporina. Si por el contrario, la vasoconstricción no se modifica, ello indicará que la producción de óxido nítrico está suprimida lo cual contribuiría a mantener la vasoconstricción.

2) Si la administración de L-arginina, precursor del factor derivado del endotelio, produce vasodilatación renal en las ratas con nefrotoxicidad inducida por ciclosporina, esto indicará la integridad del endotelio vascular y por lo tanto que su capacidad para producir óxido nítrico se encuentra conservada. Si por el contrario, la L-arginina no modifica la vasoconstricción, ello indicará incapacidad de las células endoteliales para producir óxido nítrico.

OBJETIVOS:

En ratas uninefrectomizadas tratadas crónicamente con ciclosporina A:

- 1) Estudiar la hemodinámica glomerular, la excreción urinaria de $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$, y la histología
- 2) Evaluar la participación del óxido nítrico en la hemodinámica glomerular, mediante la inhibición de la síntesis de óxido nítrico
- 3) Evaluar la capacidad del endotelio renal para producir óxido nítrico con la infusión de L-arginina, mediante la respuesta en la hemodinámica glomerular y en la excreción urinaria de $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$.

MATERIAL Y METODOS:

I.- PRODUCCION DEL MODELO EXPERIMENTAL.

Se utilizaron ratas Wistar macho con un peso entre 300-350 g. Bajo anestesia general con éter, se realizó uninefrectomía mediante una incisión de lumbotomía derecha y los animales se dejaron evolucionar durante 15 días, permitiéndoseles libre acceso a comida y agua.

Las ratas se dividieron en dos grupos, uno que recibió vehículo 0.1 ml de aceite de oliva s.c., el cual sirvió como grupo control y el otro que recibió ciclosporina a una dosis de 30 mg/kg s.c. por día durante 30 días. El grupo control fue alimentado en forma pareada, es decir, la cantidad promedio de alimento que consumían las ratas tratadas con ciclosporina fue proporcionado al grupo control. Se llevaron a cabo los estudios de micropunción 30 días después, en los siguientes grupos de ratas:

II.- PROTOCOLOS EXPERIMENTALES.

Nefrotoxicidad por ciclosporina.

Se estudió la hemodinámica glomerular en 16 ratas uninefrectomizadas tratadas con ciclosporina, CyA, y en 20 ratas uninefrectomizadas que recibieron vehículo, V, las cuales fueron usadas como grupo control. Mediante el estudio de estos dos grupos se establecieron las diferencias en la hemodinámica glomerular que produjo la administración crónica de ciclosporina.

Efecto de la inhibición de la síntesis de óxido nítrico.

En un grupo de 6 ratas tratadas con ciclosporina, CyA+NAME y 6 ratas controles, V+NAME, se evaluó la hemodinámica glomerular en dos periodos, en condiciones basales y durante la inhibición de la síntesis de óxido nítrico con NAME. Se administró un bolo de 10 mg/kg de NAME seguido de una infusión de 50 μ g/kg/min y después de 30 minutos de equilibrio se repitieron las mediciones de la hemodinámica glomerular.

Efecto de la estimulación de la síntesis de óxido nítrico.

En un grupo de 6 ratas tratadas con ciclosporina (CyA+ARG) y 9 ratas controles (V+ARG) se efectuó la medición de la hemodinámica glomerular en condiciones basales y durante la estimulación de la síntesis de óxido nítrico con L-arginina al 15% a una velocidad de 2.2 ml/h.

III.- ESTUDIOS DE MICROPUNCION.

Preparación Quirúrgica:

Después de 30 días de evolución, se estudió la hemodinámica glomerular en el riñón izquierdo. Las ratas se anestesiaron con pentobarbital sódico (30 mg/kg de peso corporal i.p.) y se instilaron dosis suplementarias en el peritoneo, conforme a requerimientos. La preparación quirúrgica se realizó de la siguiente manera: se colocó a la rata en una mesa termoregulada en 37 °C, se cateterizó la tráquea con un tubo de polietileno, PE-240, las venas yugulares y ambas arterias femorales con tubo de polietileno, PE-50 y el uretero izquierdo con tubo de polietileno, PE-10. Se expuso el riñón a través de una incisión en la línea media, después de disecar el tejido adiposo perirrenal se colocó en una cápsula de lucita, conservando su posición fisiológica, sin comprimir el uretero ni el pedículo renal. El espacio entre la cápsula y el riñón se llenó con un elastómero (Xantopren, Bayer) y la superficie del riñón se cubrió con solución de Ringer tibia. El riñón se iluminó con una luz fría transmitida por una fibra óptica; esta luz permite visualizar claramente los túbulos y capilares de la corteza renal con un microscopio estereoscópico (Nikon SMZ-10, Japón). Uno de los catéteres femorales se utilizó para obtener muestras de sangre periódicamente y el otro para monitorear en forma continua la tensión arterial media, TAM, mediante un transductor de presión (modelo P23db, Statham Instruments, Gould Division Inc. Hato Rey, Puerto Rico), conectado a un polígrafo (Grass Model RPS 7C8, Instruments, Quincy, Mass. EUA). Las muestras de sangre se repusieron en

forma simultánea con el mismo volumen de sangre obtenida de una rata donadora.

Las ratas se mantuvieron en condiciones de euvolemia mediante la administración intravenosa de plasma isoncótico de rata a dosis de 10 ml/Kg de peso corporal en una hora, seguida de una infusión de polifructosan (Inutest Laevosan-Gesellschaft, Viena) al 25% en solución Ringer por vía intravenosa a razón de 2.2 ml/h, durante todo el experimento. Después de un periodo de equilibrio de 60 min, se inició una recolección de orina de 30 a 40 min en tubos de plástico eppendorf con aceite mineral previamente pesados en una balanza analítica. El volumen urinario se calculó por la diferencia de pesos entre el tubo con la muestra recolectada y el tubo previamente pesado. Al principio y al final de cada recolección de orina se obtuvieron muestras de sangre. Simultáneamente a la recolección de orina, se obtuvieron muestras por micropunción de el líquido tubular y de sangre de la arteriola eferente y también se midió la presión intratubular y capilar peritubular.

Medición de la presión intratubular y capilar peritubular.

Para la medición de la presión tubular se utilizó un equipo Servo Null (Servonulling Pressure System model 4A, Instrumentation for Physiology and Medicine Inc. San Diego CA. EUA) conectado a un transductor de presión (modelo P23db, Statham Instruments, Gould Division Inc. Hato Rey, Puerto Rico), a una bomba de presión y a un polígrafo (Grass Model RPS 7C8, Instruments, Quincy, Mass. EUA) calibrado previamente a presiones entre 0 y 50 mm Hg. El equipo detecta cambios en la conductividad eléctrica dentro de la pipeta de punción, la cual este llena con una solución salina 1 M. Al introducir la pipeta en el capilar o en el túbulo ingresa a dicha pipeta solución relativamente hipotónica, disminuyendo la conductividad dentro de la pipeta, lo cual es detectado por el "Servo Null", que activa una bomba y aumenta la presión hasta

igualar la presión con la de la cavidad en cuestión, recuperándose la conductividad inicial dentro de la pipeta; el transductor mide la presión que la bomba aplicó al sistema para igualarla a la de la cavidad en estudio, la cual es registrada en el polígrafo.

Para medir la presión intratubular y la presión intracapilar se utilizaron pipetas de vidrio con diámetro de la punta de 5 a 7 μm . Para medir la presión intratubular con bloqueo de flujo, se interrumpió el flujo del líquido tubular mediante una columna de aceite mineral, coloreado con Sudán negro, se inyectó en la luz tubular a través de una pipeta de vidrio con un diámetro de la punta de 9 a 11 μm y se conservó en posición estable por un mínimo de 30 segundos, la pipeta del servo null se colocó en el segmento más proximal del túbulo bloqueado y se registró la presión intratubular necesaria para detener el flujo tubular y la filtración glomerular, esto permite calcular indirectamente la presión dentro del capilar glomerular. Posteriormente se midieron la presión hidrostática tubular a flujo libre y la presión hidrostática en los capilares peritubulares en forma directa.

Toma de muestras de micropunción.

Para la obtención de las muestras tubulares se utilizaron pipetas de diámetro en la punta de 9 a 11 μm , llenas con aceite mineral coloreado con Sudán negro, fijas a un adaptador conectado a una jeringa de 20 ml de tal manera que la jeringa permite aspirar o inyectar a través de la micropipeta. El adaptador con la micropipeta se montó en un manipulador Leitz, que permite realizar movimientos finos a la micropipeta. Con estas pipetas se puncionaron los túbulos proximales en un punto cercano a la emergencia de la arteriola eferente que corresponde a las porciones terminales del túbulo proximal. Para recolectar el líquido tubular se inyectó una pequeña columna de aceite con el objeto de bloquear la luz tubular y permitir el paso libre del líquido tubular al

interior de la pipeta. En todos los experimentos se obtuvieron 5 a 6 muestras de líquido tubular de 3 a 4 min c/u. A continuación, se puncionó con pipetas de 13 a 15 μm la arteriola eferente en su emergencia a la superficie, este sitio puede reconocerse fácilmente por su aspecto en forma de estrella y se obtuvieron muestras de 100 a 200 nl para la determinación de proteínas en el plasma. La concentración de proteínas en la arteriola aferente se midió en las muestras de sangre arterial, obtenidas de el catéter de la arteria femoral.

En aquellos experimentos en los que se realizaron dos periodos, las mediciones anteriores se determinaron nuevamente después de un periodo de equilibrio de 30 minutos de haber iniciado la infusión de nitro arginina metil ester ó L-arginina según el experimento.

Microscopía de luz y electrónica.

Después de terminar los estudios de micropunción se ligó la aorta por arriba de las arterias renales y se ligó el tronco celiaco. El riñón se lavó con amortiguador de fosfatos 0.13 M (pH 7.4) durante uno o dos min para eliminar la sangre de los vasos renales, inyectándolo por la arteria femoral a una presión constante y similar a la tensión arterial que tenía previamente la rata, uno de los catéteres de las arterias femorales se utilizó para inyectar el buffer y el otro para monitorear en forma continua la presión de la inyección. Posteriormente se extrajo el riñón y se dividió en dos partes, una de ellas se suspendió en Bouin alcohólico para la microscopía de luz y la otra en formaldehído para la microscopía electrónica. Para el análisis histopatológico las muestras fueron evaluadas por el método doble ciego.

IV.- MICROANALISIS Y METODOS ANALITICOS:

El volumen de las muestras tubulares se midió con un capilar de cuarzo de diámetro constante, previamente calibrado, que permite medir volúmenes en nanolitros con un error del 2%. La concentración de polifructosan tubular se

midió por triplicado por el método microfluorométrico de Vureck y Pegram (54). Las concentraciones de polifructosan en muestras de sangre y orina se midieron con la técnica de antrona de Davidson y Suckner (55). La concentración de proteínas se midió por duplicado mediante el micrométodo fluorométrico de Viets y col. (56) en el plasma de la sangre tomada de las arteriolas eferentes y de la arteria femoral.

Cuantificación de $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$.

En 5 ratas de cada grupo se determinaron los metabolitos estables de la síntesis de óxido nítrico NO_2^- y NO_3^- en condiciones basales y durante la infusión de NAME o L-arginina. Las muestras de orina obtenidas durante los estudios de micropunción se incubaron con *E. coli* nitrato reductasa en buffer de fosfatos-formato de amonio (pH=7.3), por 1 h a 37°C, para convertir los NO_3^- en NO_2^- , como se describió previamente por Bartholomew (57) y Granger y col. (58) Por medio del reactivo de Griess se desarrolló color en las muestras, las cuales se leyeron en un espectrofotómetro en luz visible y se determinó la cantidad de NO_2^- utilizando estándares de concentraciones conocidas de NaNO_2 y NaNO_3 .

Para preparar la enzima, la *E. Coli* se colocó en un medio rico en nitratos en condiciones anaérobicas durante 18 h, después se lavó varias veces, se resuspendió en una solución buffer de fosfatos y se congeló a -70°C, para su posterior utilización.

V.- CALCULOS.

Con las mediciones y determinaciones anteriores se calcularon los siguientes parámetros: la filtración glomerular por nefrona (FG/n), la presión del capilar glomerular (PCG), la fracción de filtración (FF/n), el flujo plasmático glomerular (FP/n), el flujo sanguíneo glomerular (FSG), las resistencias aferente

y eferente (RA y RE), la presión efectiva de filtración (PEF) y el coeficiente de ultrafiltración (Kf) con las siguientes fórmulas:

$$FG/n = (LT/P)_{poli} \cdot VF$$

en donde $(LT/P)_{poli}$ es el cociente de la concentración de polifructosan en el líquido tubular entre la concentración de polifructosan en el plasma y VF es la velocidad del líquido tubular que se obtiene al dividir el volumen del líquido tubular entre el tiempo de recolección de la muestra.

La presión oncótica, Π , se calculó a partir de la concentración de proteínas, C, con la ecuación de Landis y Pappenheimer:

$$\Pi = 1.63C + 0.294C^2$$

$$PCG = SFP + \Pi A$$

donde SFP es la presión tubular a flujo detenido y ΠA es la presión oncótica aferente.

$$FF/n = 1 - \frac{CA}{CE}$$

donde CA y CE son las concentraciones de proteína aferente y eferente respectivamente.

$$FP/n = \frac{FG/n}{FF/n}$$

donde FF/n es la fracción de filtración por nefrona.

$$FSG = \frac{FP/n}{1 - Htc}$$

donde Htc es el hematocrito.

$$RA = \frac{TAM - PCG}{FSG} \times 7.962$$

$$RE = \frac{PCG - Pc}{FSG} \times 7.962$$

donde TAM es la tensión arterial media, y Pc la presión capilar peritubular.

$$PEF = \frac{(PCG - \Pi A - FF) + (PCG - \Pi E - FF)}{2}$$

donde ΠE es la presión oncótica eferente y FF es la presión tubular a flujo libre.

$$Kf = \frac{(FGN / PEF)}{60}$$

VI.- ANALISIS ESTADISTICO.

Los resultados obtenidos son expresados como un promedio \pm el error estándar para cada grupo de ratas estudiado. Las diferencias encontradas en cada grupo se determinaron por medio de la T de Student pareada y las comparaciones entre grupos se analizaron por ANOVA con un diseño para mediciones repetidas y cuando fue apropiado se aplicó la prueba de T de Student no pareada. Cuando el valor de F alcanzó una $p < 0.05$, las diferencias encontradas se consideraron como estadísticamente significativas.

RESULTADOS.

Nefrotoxicidad por ciclosporina:

Los efectos producidos, por la administración crónica de ciclosporina en la microcirculación renal, se muestran en la tabla 1 y figura 1.

El peso corporal (PC) fue similar en ambos grupos de ratas; sin embargo, en las ratas que recibieron ciclosporina el peso renal (PR) fue significativamente menor que en el control; también se observó una ligera disminución en el hematocrito (Htc).

Las ratas tratadas con ciclosporina presentaron una tensión arterial media ligeramente menor que el grupo control, pero dentro de valores normales. Este grupo se caracterizó por una marcada vasoconstricción renal, como lo demuestra la elevación de las resistencias arteriolares aferente y eferente que produjo, una disminución del 51.5% en el flujo plasmático por nefrona, respecto al grupo control. Además se observó un descenso considerable del coeficiente de ultrafiltración. Los otros dos determinantes de la filtración glomerular, la presión hidrostática y la oncótica glomerular, no se modificaron, siendo la disminución del flujo plasmático y del coeficiente de ultrafiltración los responsables de que la filtración glomerular por nefrona disminuyera en un 53% (de 38.5 a 18.5 ml/min) y de la disminución de la filtración total del riñón en un 68%.

La vasoconstricción inducida por ciclosporina también se asoció con una inhibición en la reabsorción tubular de sodio. La reabsorción fraccional proximal estimada a partir de la relación promedio de la concentración de polifructosan en túbulo dividida entre la concentración en plasma, TF/P polifructosan, disminuyó significativamente al compararse con el grupo control. La reabsorción proximal absoluta (RPA) disminuyó debido a la reducción en la reabsorción proximal fraccional y en la carga filtrada, causada esta última por la caída de la

filtración glomerular por nefrona. La excreción urinaria de sodio, UNaV, fue similar en ambos grupos; sin embargo, la excreción fraccional de sodio fue ligeramente mayor en las ratas tratadas con ciclosporina.

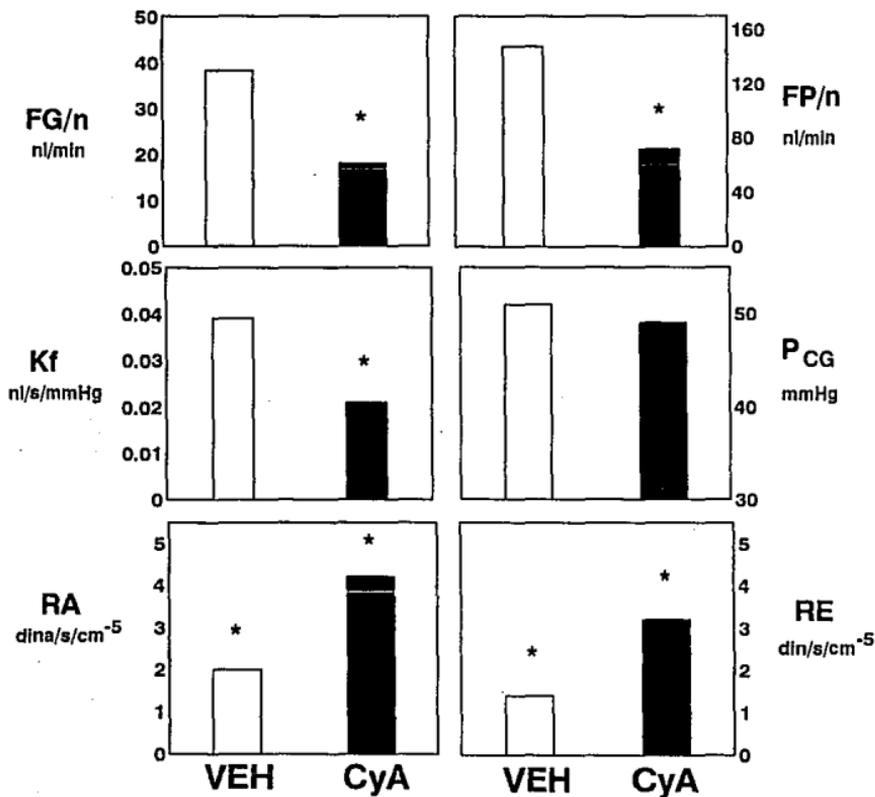
La figura 2 muestra los valores obtenidos en la excreción urinaria de $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$, y claramente demuestra que la ciclosporina no modificó la excreción de estos metabolitos, 5.6 ± 1.7 para el grupo control y 5.3 ± 2.4 nMol/min/g PR para el grupo con ciclosporina.

La micrografía 1 muestra los hallazgos encontrados en el análisis de microscopía de luz para el grupo que recibió ciclosporina, el cual presentó vacuolización difusa de las células epiteliales del túbulo proximal; capilares peritubulares dilatados con algunos leucocitos y también edema intersticial moderado. No se encontraron lesiones en los vasos glomerulares. El análisis de microscopía electrónica confirmó las alteraciones encontradas con la microscopía de luz.

TABLA 1. HEMODINAMICA GLOMERULAR EN LA NEFROTOXICIDAD POR CICLOSPORINA.

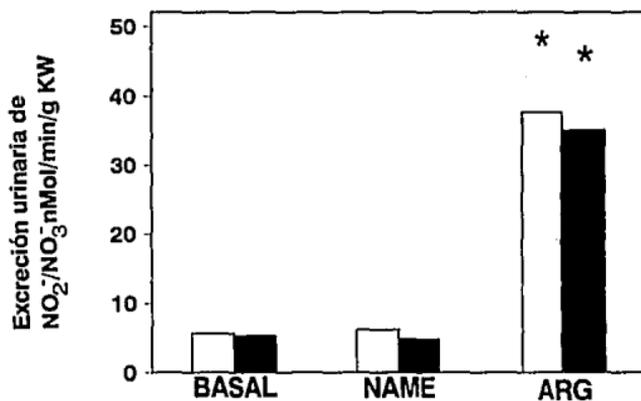
Grupo	Vehículo (n=20)	Ciclosporina (n=16)	
PC g	341.9±8.0	328.9±9.7	N.S.
PR g	2.0±0.1	1.7±0.1	p<.005
Htc	47.5±0.9	42.9±0.7	p<.0005
TAM mmHg	116.2±2.1	107.8±2.8	p<.01
FP/n nl/min	147.5±5.9	71.5±5.8	p<.0005
RA dina.seg.cm⁻⁵	2.0±0.1	4.2±0.5	p<.0005
RE dina.seg.cm⁻⁵	1.4±0.1	3.2±0.3	p<.0005
SFP mmHg	32.5±0.6	31.5±0.6	N.S.
PT mmHg	11.2±0.3	11.4±0.4	N.S.
PCP mmHg	10.9±0.3	10.7±0.9	N.S.
TA mmHg	18.5±0.4	17.6±0.5	N.S.
TE mmHg	28.4±0.06	27.2±0.08	N.S.
PCG mmHg	51.0±0.06	49.0±0.08	N.S.
Kf nl/seg/mmHg	0.039±0.002	0.021±.002	p<.0005
FG/n nl/min	38.2±1.6	18.0±1.5	P<0.0005
FG ml/min	1.3±0.1	0.4±0.01	p<.005
FF/n	0.3±0.01	0.3±0.01	N.S.
TF/P polifructosan	2.1±0.2	1.7±0.2	p<.025
R. P. F. %	0.5±0.02	0.3±0.05	p<.005
R. P. A. nl/min	18.5±1.3	7.0±1.4	p<.0005
UNaV μeq/min	0.3±0.04	0.3±0.13	N.S.
FENa %	0.2±0.1	0.8±0.3	p<.01

FIG. 1.- NEFROTOXICIDAD POR CICLOSPORINA



* p < 0.05 VS. CONTROL

FIG. 2.- EXCRECION URINARIA DE NO_2^- / NO_3^- ANTES Y DURANTE LA INFUSION DE NAME O L-ARGININA.





**Micrografía 1.- Alteraciones histológicas producidas por
la administración crónica de ciclosporina**

Efecto de la inhibición de la síntesis de óxido nítrico.

La tabla 2 y la figura 3 muestran los resultados obtenidos en la hemodinámica glomerular antes y durante la inhibición de la síntesis de óxido nítrico mediante la infusión de nitro metil éster de arginina, NAME y en la figura 4 se representa la respuesta porcentual a la inhibición de óxido nítrico.

En las ratas que recibieron vehículo, la infusión de NAME incrementó la tensión arterial media y produjo vasoconstricción renal. El flujo plasmático por nefrona disminuyó en un 28.8%, debido a la elevación de las resistencias vasculares, sin embargo, la resistencia eferente aumentó en mayor proporción que la resistencia aferente, 75 y 54.6%. El aumento del 16.7% en la presión capilar glomerular fue el resultado de la elevación en la tensión arterial y de la vasoconstricción predominantemente eferente. El NAME también produjo una disminución del coeficiente de ultrafiltración. La disminución en el flujo plasmático por nefrona y en el coeficiente de ultrafiltración ocasionaron que la filtración glomerular por nefrona disminuyera en un 28.9%, a pesar del incremento en la presión intraglomerular. A nivel tubular, la inhibición del óxido nítrico produjo una ligera disminución de la reabsorción proximal fraccional que asociada en la disminución de la carga filtrada, produjo un importante descenso en la reabsorción proximal absoluta. A pesar de estos cambios la excreción fraccional de sodio aumentó hasta el 3.5%.

En el grupo que recibió ciclosporina, la infusión de NAME produjo un cambio similar en la tensión arterial media comparados con el grupo que recibió vehículo, sin embargo, a diferencia del grupo control, la vasoconstricción inducida fue más acentuada, se observó una vasoconstricción predominantemente preglomerular, la resistencia aferente se elevó en un 90.9%, mientras que la eferente solo el 51.4%. El flujo plasmático glomerular disminuyó en un 37.6%, descenso ligeramente mayor que el observado en los

controles, 28.8%. La presión intraglomerular disminuyó un 11.6%, debido a que la resistencia aferente aumentó en mayor proporción que la eferente. Los valores de Kf basales se encontraron bajos y no disminuyeron más con la administración de NAME. La filtración glomerular por nefrona disminuyó como consecuencia de la caída en la presión intraglomerular y en el flujo plasmático.

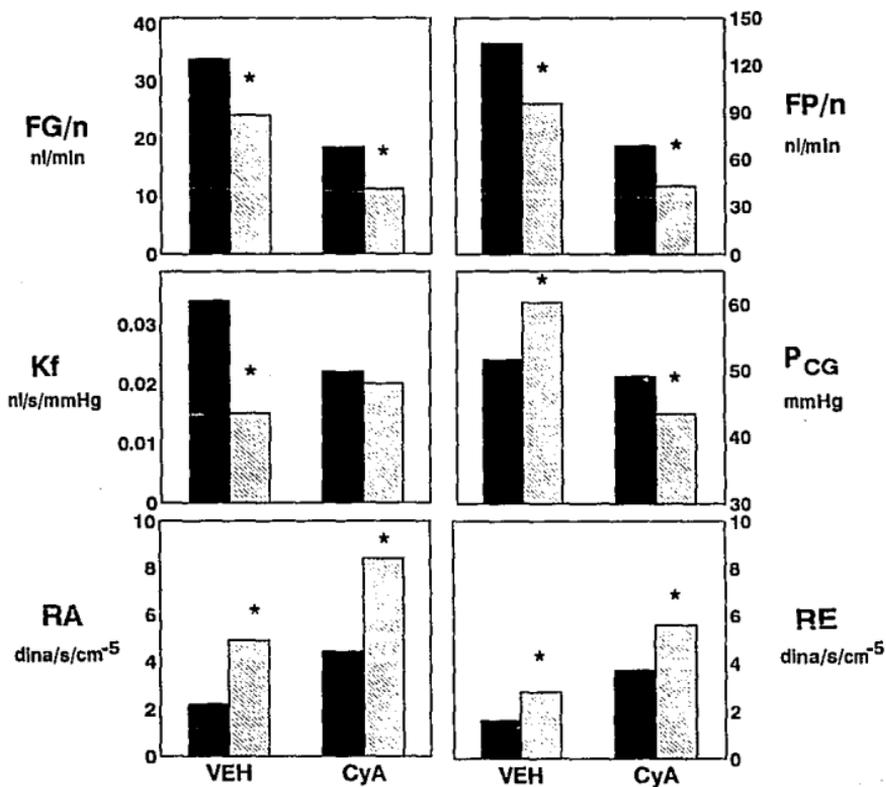
Al igual que en el grupo control, la infusión del inhibidor aumentó la excreción fraccional de sodio hasta un 16.5%, a pesar de la reducción en la reabsorción proximal absoluta y en el flujo distal.

No se encontraron diferencias en la excreción urinaria de $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$, antes y durante la inhibición del óxido nítrico en ninguno de los dos grupos estudiados. En las ratas con vehículo la excreción fue 5.6 ± 1.7 y permaneció en 6.2 ± 3.3 nmol/min/g PR y en el grupo con ciclosporina fue de 5.3 ± 2.4 y se mantuvo en 4.8 ± 2.4 nmol/min/g PR

TABLA 2: HEMODINAMICA GLOMERULAR ANTES Y DURANTE LA INFUSION DE NAME.

	TAM	FP/n	RA	RE	PCG	KF	FG/n	¶A	¶E	FF/n	RPA	FENa
	mmHg	nl/min	-dina/s/cm ⁻⁵ -	mmHg	mmHg	nl/s/mmHg	nl/min	—mmHg—	—mmHg—		nl/min	%
V	116.5±4.5	133.9±9.8	2.2±0.3	1.6±0.1	51.6±0.7	0.034±.002	33.9±2.5	18.8±0.9	29.0±1.4	0.25±.004	17.6±3.4	0.13±0.02
V+NAME	130.5±3.6*	95.4±6.5*	3.4±0.2*	2.8±0.2*	60.2±1.3*	0.015±001*	24.1±2.0*	16.9±1.1*	26.0±1.6*	0.25±.005	10.0±1.7*	3.50±1.3*
	p<.005	p<.01	p<.005	p<.003	p<.003	p<.0005	p<.01	p<.003	p<.003	N.S.	p<.025	p<.025
CYA	105.6±1.8	68.6±10.6	4.4±0.7	3.7±0.7	49.1±2.0	0.022±.005	18.5±2.6	17.7±0.9	28.1±1.5	0.27±.002	9.3±1.8	1.20±0.6
CYA+NAME	119.3±3.5*	42.8± 8.6*	8.4±1.3*	5.6±1.0	43.4±1.8*	0.020±.006	11.2±2.2*	17.5±0.8	28.1±1.5	0.27±.008	5.6±1.0*	16.50±5.5*
	p<.005	p<.003	p<.005	p<.035	p<.0005	N.S.	p<0.003	N.S.	N.S.	N.S.	p<.01	p<.01

FIG. 3.- EFECTO DE LA INHIBICION DEL OXIDO NITRICO

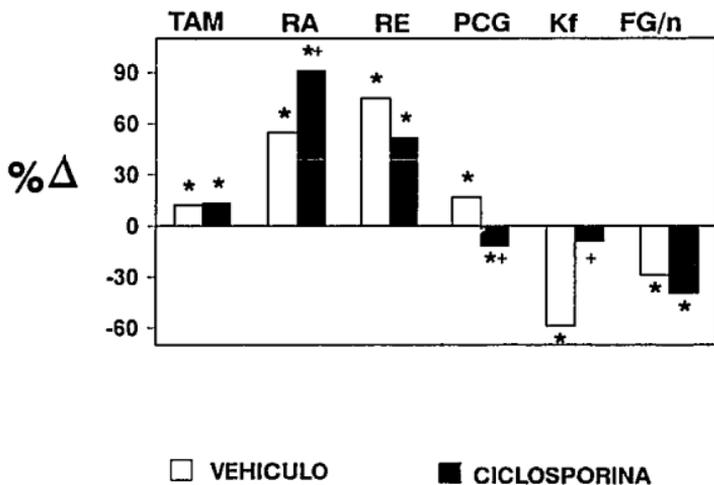


* p < 0.05 VS. CONTROL

■ Control

▨ NAME

FIG. 4.- RESPUESTA HEMODINAMICA GLOMERULAR A LA INHIBICION DE OXIDO NITRICO.



* p<0.05 vs. BASAL

+ p<0.05 vs. CONTROL

Efecto de la estimulación de la síntesis de óxido nítrico.

En la tabla 3 y figura 5 se muestra la respuesta renal obtenida al estimular la síntesis de óxido nítrico, mediante la infusión de L-arginina y en la figura 6 se representa de forma porcentual esta respuesta.

En las ratas que recibieron vehículo, la arginina produjo un efecto vasodilatador, la tensión arterial media disminuyó 6.1%. El flujo plasmático aumentó en un 72.8% debido a que las resistencias pre y pos-glomerulares disminuyeron, 44.4% y 38.5% respectivamente. Dado que ambas resistencias disminuyeron en la misma proporción, la presión intraglomerular no se modificó y el Kf aumentó un 63.2%. La filtración glomerular por nefrona se elevó en un 72.6% por el incremento en el flujo plasmático glomerular y el Kf. La infusión de arginina produjo un aumento del 41.8% en la reabsorción proximal fraccional que asociado con el incremento en la carga filtrada dio como resultado un aumento en la reabsorción proximal absoluta del 149%. Cuando se calculó el flujo del túbulo proximal no se encontraron diferencias, sin embargo, la excreción fraccional de sodio aumentó 19 veces.

En el grupo tratado con ciclosporina, el cual presentaba vasoconstricción crónica, la estimulación de la síntesis de óxido nítrico produjo cambios similares a los observados en el grupo control. Se observó una marcada vasodilatación, la tensión arterial media disminuyó 4.5%, el flujo plasmático por nefrona aumentó en un 107.1%, debido a que las resistencias aferente y eferente disminuyeron en un 55.3% y 51.6% respectivamente. La disminución de las resistencias en la misma proporción originó que la presión capilar glomerular no se modificara. El Kf aumentó y el incremento porcentual fue estadísticamente mayor que el observado en el control, 85.2% vs. a 63.2%. La filtración glomerular por nefrona aumentó en mayor proporción que en el grupo control, 114.9% vs a 72.6%, debido al aumento de el Kf en mayor magnitud. Sin

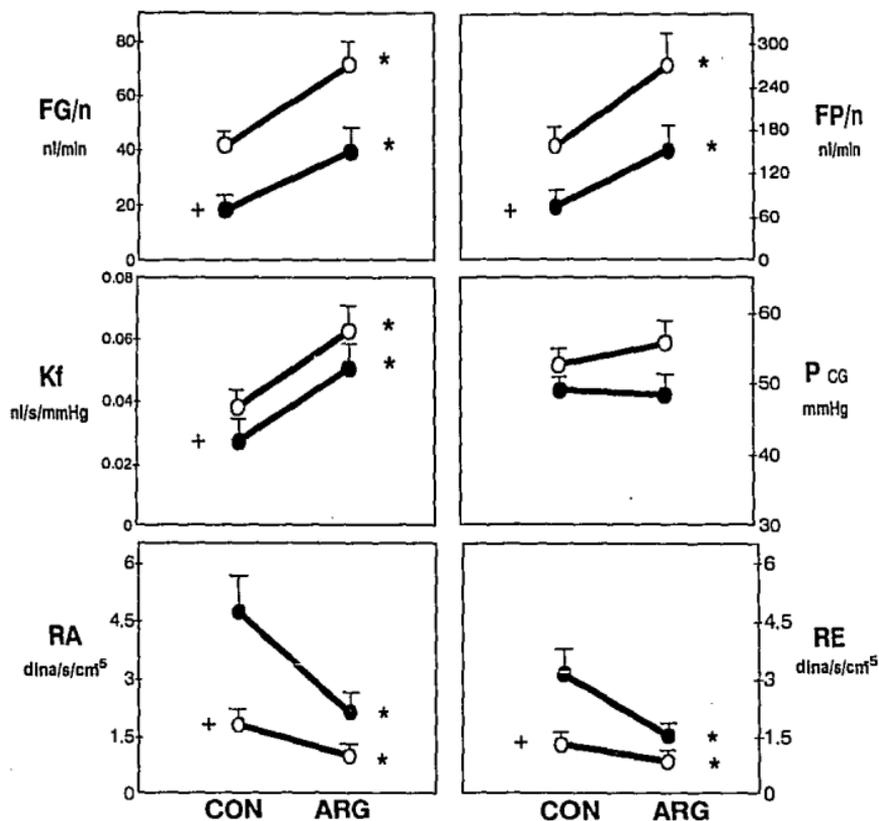
embargo, a pesar del incremento de los parámetros mencionados los valores alcanzados fueron inferiores de los observados en el grupo control. La infusión de arginina produjo un aumento significativo en la reabsorción tubular proximal absoluta y fraccional la excreción fraccional de sodio aumentó 3 veces.

La estimulación de la síntesis de óxido nítrico produjo un aumento significativo en la excreción urinaria de $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$, en ambos grupos. En el control la excreción aumento de 5.6 ± 1.7 a 37.6 ± 6.3 nmol/min/g PR y en el grupo con ciclosporina de 5.3 ± 2.4 a 35.0 ± 8.3 nmol/min/g PR ($p < 0.05$)

TABLA 3: HEMODINAMICA GLOMERULAR ANTES Y DURANTE LA INFUSION DE L-ARGININA.

	TAM	FP/n	RA	RE	Pcg	KF	FG/n	¶A	¶E	SNFF	RPA	FENa
	mmHg	nl/min	—dina/s/cm ⁻⁵ —	mmHg	mmHg	nl/s/mmHg	nl/min	—mmHg—	—mmHg—		nl/min	%
V	119.0±1.8	155.3±11.1	1.8±0.2	1.3±0.1	52.5±1.2	0.038±.003	41.2±3.4	17.9±0.5	28.1±0.8	0.26±0.01	17.1± 1.8	0.2±0.1
V+ARG	111.7±2.4*	268.4±27.7*	1.0±0.1*	0.8±0.1*	55.4±2.0	0.062±.006*	71.1±7.4*	16.5±0.5*	26.1±0.7*	0.27±0.01	42.6±15.5	3.8±1.1*
	p<.025	p<.0005	p<.0005	p<.0005	N.S.	p<.0025	p<.0005	p<.005	p<.005	N.S.	p<.0005	p<.0125
CYA	115.3±5.4	72.2±13.3	4.7±0.3	3.1±0.5	48.9±1.1	0.027±.009	18.1±3.5	18.1±0.9	28.1±1.2	0.25±0.02	3.9±5.1	0.9±0.2
CYA+ARG	110.1±4.7*	149.5±26.4*	2.1±0.3*	1.5±0.1	48.2±1.4	0.050±.014*	38.9±6.8*	16.7±0.8*	26.2±1.1*	0.26±0.01	16.6±5.8*	3.0±0.7*
	N.S.	p<.005	p<.01	p<.01	N.S..	p<.0025	p<0.0025	p<.005	p<.025	N.S.	p<.0005	p<.005

FIG. 5.- RESPUESTA HEMODINAMICA GLOMERULAR A L-ARGININA



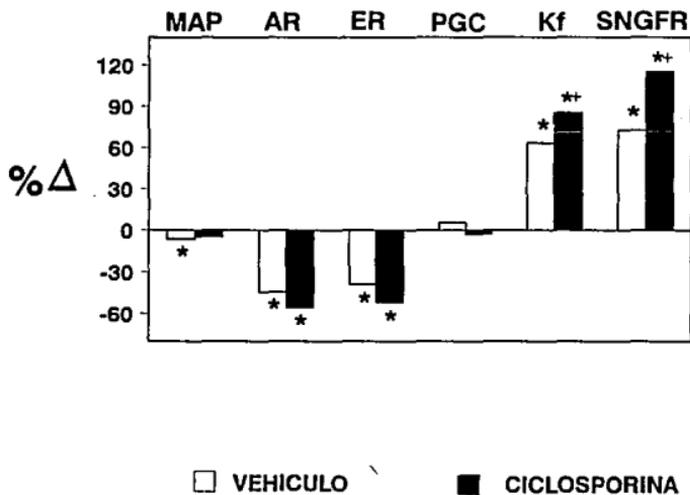
* P < 0.05 VS. CONTROL

+ p < 0.05 vs VEHICULO

○ Vehículo

● Ciclosporina

FIG. 6.- RESPUESTA HEMODINAMICA GLOMERULAR A LA ESTIMULACION DE OXIDO NITRICO.



* p < 0.05 vs. BASAL

+ p < 0.05 vs. CONTROL

RESUMEN DE RESULTADOS:

- 1.1. La administración subcutánea de ciclosporina durante 30 días a ratas uninefrectomizadas produjo vasoconstricción arteriolar pre y pos glomerular y esto a su vez ocasionó que el flujo plasmático por nefrona disminuyera, también produjo un descenso importante del coeficiente de ultrafiltración. La disminución de estos dos parámetros ocasionó que tanto la filtración glomerular total como la filtración glomerular por nefrona disminuyeran.
- 1.2 A nivel tubular la CyA produjo disminución de la reabsorción fraccional proximal y de la reabsorción proximal absoluta. La excreción urinaria de sodio, UNaV, fue similar en ambos grupos; sin embargo, la excreción fraccional de sodio fue ligeramente mayor en las ratas tratadas con ciclosporina.
- 1.3 La ciclosporina no modificó la excreción urinaria de $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$.
- 1.4 La microscopía de luz y electrónica reveló vacuolización difusa de las células epiteliales del túbulo proximal; capilares peritubulares dilatados con algunos leucocitos y también edema intersticial moderado. No se encontraron lesiones en la vasos glomerulares.
- 2.1 La inhibición de la síntesis de óxido nítrico en las ratas controles produjo: elevación de la tensión arterial media y de las resistencias vasculares, sin embargo, la resistencia eferente aumentó en mayor proporción que la resistencia aferente. El flujo plasmático por nefrona disminuyó debido a la vasoconstricción observada. La presión capilar glomerular aumentó y el coeficiente de ultrafiltración disminuyó. Como resultado de la modificación de los parámetros anteriores la filtración glomerular por nefrona disminuyó.

- 2.2 A nivel tubular, la inhibición del óxido nítrico produjo disminución de la reabsorción proximal fraccional y absoluta. A pesar de estos cambios la excreción fraccional de sodio aumentó.
- 2.3 En el grupo que recibió ciclosporina el cual presentaba vasoconstricción crónica, la inhibición del óxido nítrico produjo: elevación de la tensión arterial media sin embargo, a diferencia del grupo control, la vasoconstricción inducida fue más acentuada, se observó una vasoconstricción predominantemente preglomerular. Produjo también disminución de el flujo plasmático glomerular y de la presión intraglomerular. Los valores de Kf basales se encontraron bajos y no se modificaron. A nivel tubular la excreción fraccional de sodio aumentó a pesar de la reducción en la reabsorción proximal absoluta y en el flujo distal.
- 2.4 Durante la inhibición la síntesis de óxido nítrico la excreción urinaria de $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ no se modificó en ningún grupo.
- 3.1 La estimulación de la síntesis de óxido nítrico en las ratas controles produjo: disminución de la tensión arterial media, aumento de el flujo plasmático glomerular por disminución de las resistencias pre y postglomerulares y aumento del Kf. La filtración glomerular por nefrona aumentó como resultado de los cambios en los parámetros hemodinámicos anteriores.
- 3.2 A nivel tubular produjo que la reabsorción proximal fraccional y absoluta y la excreción fraccional de sodio aumentarían.
- 3.3 En el grupo tratado con ciclosporina, la estimulación de la síntesis de óxido nítrico produjo: disminución de la tensión arterial media, aumento en el flujo plasmático por nefrona, debido al incremento en las resistencias aferente y

eferente. El K_f también aumentó. La filtración glomerular por nefrona aumentó como resultado de la vasodilatación observada.

- 3.4 A nivel tubular se observó un aumento significativo en la reabsorción tubular proximal absoluta y fraccional y en la excreción fraccional de sodio.
- 3.5 Cuando se estimuló la síntesis de ON con L-arginina, la excreción urinaria de $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ aumentó 6 veces tanto en el control como en el grupo con ciclosporina.

DISCUSION

En el presente trabajo se estudió el efecto de la administración crónica de ciclosporina a ratas uninefrectomizadas, el cual es un modelo con cambios compensatorios similares a los observados en pacientes con trasplante renal. Estudios previos en ratas uninefrectomizadas la ciclosporina produjo disminución de la función renal sin que ocurriese vasoconstricción renal; Winston y col. (59) y Gillum y col. (60) propusieron que la vasodilatación compensatoria presente en el riñón remanente antagoniza los cambios en las resistencias arteriolares inducidos por ciclosporina. En el estudio de Winston y col. (59) la disminución de la filtración glomerular por nefrona fue causada por la caída del coeficiente de ultrafiltración y en el estudio de Gillum y col (60) no se realizaron estudios de micropunción. Sin embargo la ausencia de vasoconstricción en estos estudios también puede explicarse porque la ciclosporina se administró durante un periodo corto (15 días) y se ha demostrado que existen diferencias importantes en las alteraciones de la función renal que dependen de la dosis, el tiempo y la ruta de administración de este inmunosupresor (61-64).

En nuestro estudio un periodo de tratamiento por 28 días, fue suficiente para elevar las resistencias renales y reducir el flujo plasmático glomerular, alteraciones características de la nefrotoxicidad por ciclosporina. También se observó una caída significativa en el coeficiente de ultrafiltración. La filtración glomerular por nefrona disminuyó en un 53% como consecuencia de la disminución en dos de sus determinantes. La ciclosporina no produjo elevación en la presión arterial media, probablemente por el efecto tóxico tubular que induce y que impide la retención de sodio y elevación de la presión que se observa en los humanos.

Cuando se evaluó la microscopía de luz y la electrónica solo se encontró toxicidad directa a nivel tubular, la ciclosporina produjo intensa vacuolización del epitelio proximal tubular. Las alteraciones en la hemodinámica glomerular no se asociaron con cambios estructurales glomerulares, lo que sugiere la presencia de una alteración funcional y reversible. El daño tubular se asoció con una disminución en la reabsorción proximal de agua y sodio, sin embargo la excreción urinaria de sodio no se modificó debido a la disminución en la carga filtrada impuesta por la disminución de la filtración glomerular por nefrona.

Por otra parte no se han establecido los mecanismos responsables de la vasoconstricción inducida por ciclosporina. La administración aguda del inmunosupresor produce elevación de factores vasoconstrictores tales como la angiotensina II (12-15), el tromboxano A_2 (16) y la endotelina (17-19), los cuales inducen contracción de las arteriolas glomerulares y de las células mesangiales (12-19). Se ha postulado que estos compuestos presores pueden ser responsables parcialmente de la vasoconstricción renal observada durante la nefrotoxicidad crónica por ciclosporina.

A este respecto, se ha observado que el tratamiento con ciclosporina produce activación del sistema renina angiotensina (14), además se ha encontrado que la ciclosporina incrementa el contenido de renina intrarrenal (13), sin embargo, cuando se ha administrado inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina II los resultados han sido contradictorios, en algunos estudios la filtración glomerular se recuperó y en otros no se encontró ningún efecto sobre la hemodinámica glomerular (9,19), por lo que se requieren mas estudios para discernir el papel de la angiotensina II en la nefrotoxicidad crónica por ciclosporina.

En ratas tratadas con ciclosporina durante 30 días, Perico y col. encontraron un aumento en la excreción urinaria de tromboxano B_2 el metabolito

del tromboxano A_2 y sugieren que el aumento en la síntesis de tromboxano A_2 cause la reducción de la filtración glomerular. También se ha observado que la inhibición de la sintetasa de tromboxanos en ratas tratadas con ciclosporina en forma crónica, produce aumento en filtración glomerular, pero el flujo plasmático glomerular no se recupera, lo que sugiere la participación de otras sustancias vasoconstrictoras (14).

Por otra parte, la ciclosporina produce daño endotelial en cultivos de células endoteliales, al incrementar la velocidad de lisis de éstas células y producir disminución de la replicación celular (23,24). Estudios en ratas han revelado que la administración aguda de ciclosporina produce elevación de los niveles circulantes de endotelina (17) y que la administración de anticuerpos anti-endotelina o bloqueadores de los receptores a endotelina restablecen completamente la filtración glomerular (17-19). Sin embargo, los niveles de endotelina regresan a niveles normales 60 min después de la administración de ciclosporina, aunque simultáneamente se produce un incremento en el número de receptores renales (25).

De acuerdo con estas observaciones es razonable suponer que el daño endotelial en la nefrototoxicidad por ciclosporina pueda alterar la producción y liberación de factores vasorelajantes. En este trabajo evaluamos la participación del óxido nítrico en la vasoconstricción inducida por la ciclosporina y observamos que la excreción urinaria de NO_2^-/NO_3^- fue similar en las ratas controles y en las ratas que recibieron ciclosporina, lo que sugiere que la producción de óxido nítrico pueda ser normal, pero insuficiente para contrarrestar el efecto vasoconstrictor asociado a ciclosporina, también es posible que las células endoteliales sean incapaces de producir óxido nítrico en respuesta a un estímulo.

Cuando se evaluó la producción basal de óxido nítrico en el grupo control, mediante el inhibidor específico de la síntesis de ON, se observó una respuesta vasoconstrictora predominantemente de la arteriola eferente, lo que originó la elevación de la presión intraglomerular; también se encontró una disminución del coeficiente de ultrafiltración, dando lugar estos cambios a una reducción significativa de la filtración glomerular por nefrona, lo cual indica que el óxido nítrico es un regulador importante del tono vascular glomerular. Por otra parte, el coeficiente de ultrafiltración es el producto de la permeabilidad glomerular y de el área de filtración y ésta última está determinada por el tono de las células mesangiales, por lo que, puede suponerse que el óxido nítrico contribuye también a mantener la relajación de las células mesangiales. En apoyo a esto, Shultz y col. (39) demostraron en preparaciones "in vitro" que el óxido nítrico producido por las células endoteliales inhibe la contracción de las células mesangiales inducida por angiotensina II.

En las ratas tratadas con ciclosporina, en las que ya existía contracción crónica de la microvasculatura renal, la administración de NAME acentuó la vasoconstricción renal, predominantemente en la vasculatura preglomerular, lo que ocasionó un descenso en la presión intraglomerular a pesar del aumento simultáneo de la presión arterial sistémica. La reducción de la presión intraglomerular ocasionó que la filtración glomerular por nefrona disminuyera aún más, lo que sugiere que en la nefrotoxicidad crónica por ciclosporina, el óxido nítrico contribuye a mantener el tono vascular preglomerular y a atenuar el efecto vasoconstrictor inducido por el inmunosupresor. Por otra parte, estos resultados descartan la posibilidad de que la producción de óxido nítrico a nivel renal se encuentre disminuida o suprimida, además la excreción urinaria de $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ fue similar con el grupo control en condiciones basales y no se modificó durante la infusión de NAME, esto puede atribuirse a la fricción capilar

(shear stress) que se dá por la elevación en la presión arterial y esto induce un aumento en la síntesis de óxido nítrico.

Los resultados obtenidos con L-arginina, sugieren que en la nefrotoxicidad por ciclosporina se conserva la capacidad para sintetizar ON. Esto también es apoyado por el aumento observado en la excreción urinaria de $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ durante la infusión de L-arginina en ambos grupos. La estimulación de la síntesis de ON produjo elevación del coeficiente de ultrafiltración en el grupo control y en el grupo con ciclosporina, este incremento en el área de filtración puede deberse a relajación de las células mesangiales, esta respuesta encontrada en ambos grupos indica que el mesangio es funcional en la nefrotoxicidad por ciclosporina.

Finalmente, se ha demostrado que el NAME incrementa la excreción urinaria de sodio, lo cual se ha atribuido a un fenómeno de natriuresis de presión que es secundario a la elevación de la presión arterial (45,50), en apoyo a esto cuando se previene la elevación de la presión arterial por administración intrarterial del inhibidor se observa una disminución de la excreción urinaria de sodio (66). En el presente estudio la inhibición de la síntesis de óxido nítrico se asoció con un incremento en la excreción urinaria de sodio, tanto en el control como en el grupo que recibió ciclosporina, a pesar de la disminución en el flujo tubular proximal, lo que indica una inhibición de la reabsorción de sodio en segmentos más distales de la nefrona.

CONCLUSIONES:

1. La vasoconstricción renal, la disminución del coeficiente de ultrafiltración y los cambios histopatológicos confirmaron la presencia de nefrotoxicidad inducida por la administración de ciclosporina.
2. La administración de ciclosporina no modificó la excreción urinaria de $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$, lo que sugiere que la síntesis de óxido nítrico es normal en este modelo.
3. La inhibición del óxido nítrico produjo vasoconstricción renal en ambos grupos de ratas, sin embargo la vasoconstricción en las ratas que recibieron ciclosporina fue mayor, como lo demuestra el incremento en la resistencia aferente y la disminución de la presión capilar glomerular.
4. Estos resultados sugieren que la producción de óxido nítrico contribuye a contrarrestar la vasoconstricción renal inducida por ciclosporina y descarta la posibilidad de una producción deficiente de óxido nítrico.
5. La respuesta hemodinámica renal y la excreción urinaria de $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ observada durante la estimulación de la síntesis de óxido nítrico con L-arginina demuestra que la ciclosporina no depime la capacidad del endotelio para producir óxido nítrico.

En conclusión los resultados obtenidos indican que la vasoconstricción observada en la nefrotoxicidad por ciclosporina no es mediada por una deficiencia de óxido nítrico, sino por el contrario, el óxido nítrico atenúa la vasoconstricción inducida por ciclosporina.

BIBLIOGRAFIA:

1. Borel J.F.: Comparative study of in vitro and in vivo drug effects on cell-mediated cytotoxicity. *Immunology* 31: 631-641, 1976.
2. Borel J.F., Feurer C., Magnee C., Stähelin H.: Effects of new antilymphocytic peptide cyclosporine A in animals. *Immunology* 32: 1017-1025, 1977.
3. Myers B.D.: Cyclosporine nephrotoxicity. *Kidney Int.* 30:964-974, 1986 .
4. Shulman H., Striker G., Deeg J.H., Kennedy M., Storb R., Thomas E.D.: Nephrotoxicity of Cyclosporine A after allogeneic marrow transplantation: Glomerular thrombosis and tubular injury. *N. Eng. J. Med.* 305: 1392-1395, 1981.
5. Myers B.D., Sibley R., Newton L., Tomlanovich S.J., Boshkos C., Stinson E., et al.: The long-term course of cyclosporine-associated chronic nephropathy. *Kidney Int.* 33: 590-600, 1988.
6. Versluis D.J., Kate F.J.W.T., Wenting G.J., Jeekel J., Weimar W.: Histological lesions associated with cyclosporine: Incidence and reversibility in one year old kidney transplants. *J. Clin. Pathol.* 41: 498-503, 1988.
7. English J., Evan A., Houghton D.C., Bennett W.M.: Cyclosporine-induce acute renal dysfunction in the rat. Evidence of arteriolar vasoconstriction with preservation of tubular function. *Transplantation* 44: 135-141, 1987.
8. Barros E., Boim M., Ajzen H., Ramos O., Schor N.: Glomerular hemodynamics and hormonal participation on cyclosporine nephrotoxicity. *Kidney Int.* 32: 19-25, 1987.
9. Sabatini M., Esposito F., Uccello L., De Nicola L. Alba M., Conte G., Dal Canton A., Andreucci V.E.: Acute effects of cyclosporine on glomerular dynamics. Micropuncture study in the rat. *Transp. Proc.* 20: 544-548, 1988.

10. Sabbatini M., De Nicola L., Uccello F., Romano G., Papaccio G., Esposito V., Sepe V., Conte G., Fuiano G.: Medium-term cyclosporine renal dysfunction and its reversibility in rats. *Am. J. Physiol.* 260: F898-F905, 1991.
11. Thomson S.C., Tucker B.J., Gabbai F., Blantz R.C.: Functional effects on glomerular hemodynamics of short-term chronic cyclosporine in male rats. *J. Clin. Invest.* 83: 960-969, 1989.
12. Choi Ch. K., Park Y. S., Lee J. Baik Y.H. The effects of cyclosporine on vascular responsiveness and renin release from the kidney. *Transplantation* 53: 1157-1160, 1992.
13. Tufro-McReddie A., Gómez A., Norling L.L., Omar A.A., Moore L.C., Kaskel F.J.: Effect of CsA on the expression of renin and angiotensin type 1 receptor genes in the rat kidney. *Kidney Int* 43: 615-622, 1993.
14. Perico N., Benigni A., Bosco E., Rossini M., Orisio S., Ghilardi F., Piccinelli A., Remuzzi G.: Acute cyclosporine A nephrotoxicity in rats: which role for renin-angiotensin system and glomerular prostaglandins?. *Clin. Nephrol.* 25: S83-S88, 1986.
15. Murray B.M., Paller M.S., Ferris T.F.: Effect of cyclosporine administration on renal hemodynamics in conscious rats. *Kidney Int.* 28: 767-764, 1985.
16. Perico N., Benigni A., Zoja C. Delaini F., Remuzzi G.: Functional significance of exaggerated renal thromboxane A2 synthesis induced by cyclosporine A. *Am. J. Physiol.* 251: F581-F587, 1986.
17. Kon V., Sigiura M., Inagami T., Harvie B.R., Ichikawa I., Hoover R.: Role of endothelin in cyclosporine-induced glomerular dysfunction. *Kidney Int.* 37: 1487-1491, 1990.
18. Fogo A., Hellings S. E., Inagami T., Kon V.: Endothelin receptor antagonism is protective in acute cyclosporine toxicity. *Kidney Int.* 42: 770-774, 1992.

19. Perico N., Dadan J., Remuzzi G.: Endothelin mediates the renal vasoconstriction induced by cyclosporine in the rat. *J. Am. Soc. Nephrol* 1: 76-83, 1990.
20. Marsden P.A., Brenner B.M.: Nitric oxide and endothelins: Novel autocrine/paracrine regulators of the circulation. *Sem Nephrol* 11: 169-185, 1991.
21. Yanakisawa M., Kurihar H., Kimura S., Tomobe Y., Kobayashi M., Mitsui M. Goto K., Masaki T.: A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 332: 411-415, 1988.
22. Kon V., Yoshioka T., Fogo A., Ichikawa I.: Glomerular actions of endothelin in vivo. *J. Clin. Invest.* 83: 1762-1767, 1989.
23. Law D.C.W., Wong K.L., Hwang W.S.: Cyclosporine toxicity on cultured rat microvascular endothelial cells. *Kidney Int.* 35: 604-613, 1989.
24. Zoja C., Ghilardi F, Zilio P., Benigni A., Remuzzi G.: Cyclosporine-induced endothelial cell injury. *Lab. Invest.* 55: 455-462, 1986.
25. Awazu M., Sugiura M., Inagami T., Ichikawa I., Kon V.: Cyclosporine promotes glomerular endothelin binding sites in vivo. *J. Am. Soc. Nephrol.* 1: 1253-1258, 1991.
26. Perico N., Remuzzi G.: Role of endothelin in glomerular injury. *Kidney Int.* 43: S76-S80, 1993.
27. Palmer R.M.J., Ferrige A.G., Moncada S.: Nitric oxide release accounts for the biological activities of endothelium derived relaxing factor. *Nature* 327: 524- 530, 1987.
28. Ignarro L.J.: Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 30: 535-540, 1990.

29. Palmer R.M., Moncada S.: A novel citrulline-forming enzyme implicated in the formation of nitric oxide by vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 158: 348-352, 1989.
30. López-Jaramillo P., González M.C., Palmer R.M., Moncada S.: The crucial role of physiological Ca^{2+} concentrations in the production of endothelial nitric oxide and the control of vascular tone. *Br J Pharmacol* 101: 483-493, 1990.
31. Palmer R.M., Ress D.D., Asthon D.S., Moncada S.: L-arginine is the physiological precursor for the formation of the nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. *Biochem Biophys Res Commun*. 153: 1251-1256, 1988.
32. Furchgott R.F., Zardawski J.V.: The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288: 373-376, 1980.
33. Garthwaite J., Charles S.L. Chess-Williams R.: Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intracellular messenger in the brain. *Nature* 336: 385-388, 1988.
34. Knowels G.K., Palacios M., Palmer R.M. Moncada S.: Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 5159-5162, 1989.
35. Ishi K., Chang B., Kerwin J.F., Wagenaar F.L. Huang Z.J., Murad F.: Formation of endothelium-derived relaxing factor in porcine kidney epithelial LLC-PK1 cells: an intra and intracellular messenger for activation of soluble guanylate cyclase. *J Pharmacol Exp Ther*. 256: 38-43, 1991.

36. Kwon N.S., Nathan C.F., Stuehr D.J.: Reduced biopterin as a cofactor in the generation of nitrogen oxides by murine macrophages. *J Biol Chem* 264: 20496-20501, 1989.
37. Kosuga K., Yul Y., Hattori R., Eizawa H., Hiki K., Kawai C.: Stabilizing factor(s) of nitric oxide (NO) synthase. *Biochem Biophys Res Commun* 172: 705-708, 1990.
38. Knowels R.G., Salter M., Brooks S.L., Moncada S.: Anti-inflammatory glucocorticoids inhibit the induction by endotoxin of nitric oxide synthase in the lung, liver and aorta of the rat. *Biochem Biophys Res Commun* 172: 1042-1048, 1990.
39. Shultz J., Schorer A.E., Raj L.: Effects of endothelium-derived relaxing factor and nitric oxide on rat mesangial cells. *Am J Physiol* 258: F162-F167, 1990.
40. Radomski M.W., Palmer R.M.J., Moncada S.: Glucocorticoids inhibit the expression of an inducible, but not the constitutive, nitric oxide synthase in vascular endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci* 87: 10043-10047, 1990.
41. Gold M.E., Bush P.A., Ignarro L.J.: Depletion of arterial L-arginine causes reversible tolerance to endothelium-dependent relaxation. *Biochem Biophys Res Commun* 164: 714-721, 1989.
42. Nüssler A., Drapier J.C., Rénia L., Pied S., Miltgen F., Mazier D.: L-arginine dependent destruction of intrahepatic malaria parasites in response to tumor necrosis factor and/or interleukin 6 stimulation. *Eur J Immunol* 21: 227-232, 1991.
43. Vallance P., Leone A., Calver A, Collier J., Moncada S.: Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet* 339: 572-575, 1992.

44. Stamler J.S., Simon D.I., Osborne J.A., Mullins M., Jaraki O., Michel T., Singel D.J., Loscalzo J.: S-nitrosylation of proteins with nitric oxide: synthesis and characterization of biologically active compounds. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 444-448, 1992.
45. Baylis C., Harton P., Engeles K: Endothelial relaxing factor controls renal hemodynamic in normal rat kidney. *J. Am. Soc. Nephrol.* 1: 875-881, 1990.
46. Zatz R., De Nucci G.: Effects of acute nitric oxide inhibition on rat glomerular microcirculation. *Am. J. Physiol.* 261: F360-F363, 1991.
47. Moncada S., Palmer R.M.J., Higgs E.A.: Biosynthesis of nitric oxide synthesis from L-Arginine. A pathway for the regulation of cell function and communication. *Biochem Pharmacol* 38: 1709-1715, 1989.
48. Gryglewski R.J., Botting R.M., Vane J.R.: Mediators produced by endothelial cell. *Hypertension* 12: 530-548, 1988.
49. Rees D.D., Palmer R.M.J. Hodson H.F., Moncada S.: A specific inhibitor of nitric oxide formation from L-arginine attenuates endothelium-dependent relaxation. *Biochem Biophys Res Commun* 153: 1251-1256, 1988.
50. Lahera V., Salom M.G., Miranda-Guardiola F., Moncada S., Romero C.: Effects of NG-nitro-L arginine methyl ester on renal function and blood pressure. *Am. J. Physiol.* 261: F1033-F1037, 1991..
51. Gardiner S.M., Compton A.M., Bennett T., Palmer R.M.J., Moncada S.: Control of regional blood pressure by endothelium-derived nitric oxide. *Hypertension* 15: 486-490, 1990.
52. Gardiner S.M., Compton A.M., Bennnett T, Palmer R.M.J., Moncada S.: Regional hemodynamic changes during oral ingestion of NG-monomethyl-L-arginine or NG-nitro-L-arginine methyl ester in conscious Brattleboro rats. *Br J Pharmacol* 101: 632-638, 1990.

53. Tollins J.P., Palmer R.M.J., Moncada S., Raji L.: Role of endothelium-derived relaxing factor in regulation of renal hemodynamic responses. *Am. J. Physiol.* 258: H655-H662, 1990.
54. Vurek G.G., Pegram S.E.: Fluorometric method for the determination of nanogram quantities of inulin. *Anal. Biochem* 16: 409-419, 1966.
55. Davidson W.D., Sackner M.A.: Simplification of the anthrone method for the determination of inulin in clearance studies. *J. Lab. Clin. Med.* 62: 351-356,
56. Viets J.W., Deen W.M., Troy J.L., Brenner B.M.: Determination of serum protein concentration in nanoliter blood samples using fluorescamine or o-phthalaldehyde. *Anal. Biochem.* 88: 513-521, 1978.
57. Bartholomew B.: A rapid method for the assay of nitrate in urine using the nitrate reductase enzyme of *Echerichia coli*. *Food Chem. Toxicol.* 22:541-543, 1984.
58. Granger D.L., Hibbs J.B., Perfect J.R. Durack D.T. Metabolic fate of L-arginine in relation to microbistatic capability of murine macrophages. *J. Clin. Invest.* 85:264-273, 1990.
59. Winston J., Feingold R., Safirstein R.: Glomerular hemodynamics in cyclosporine nephrotoxicity following uninephrectomy. *Kidney Int.* 35: 1175-1182, 1989.
60. Gillum D. M., Truong L., Tasby J., Suki W.N.: Effects of uninephrectomy and high protein feeding in cyclosporine nephropathy. *Kidney Int.* 36: 194-200, 1989.
61. Wassef R., Cohen Z., Langer B.: Pharmacokinetic profiles of cyclosporine in rats. Influence of route of administration and dosage. *Transplantation* 40: 489-493, 1985.
62. Sullivan B.A., Hak L.J., Finn W.F.: Cyclosporine nephrotoxicity: studies in laboratory animals. *Transplantation Proc* XVII: 145-154, 1985.

63. Jackson N.M., Hsu Ch., Visscher E.G., Venkatachalam M.A., Humes D.: Alterations in renal structure and function in rat model cyclosporine nephrotoxicity. *J Pharmacol Exp Ther* 242: 749-756, 1987.
64. Gerkens J.F.: Cyclosporine treatment of normal rats produces a rise in blood pressure and decreased renal vascular responses to nerve stimulation, vasoconstrictors and endothelium-dependent dilators. *J Pharmacol Exp Ther* 1105-1112, 1989.
65. Bertani T., Perico N., Abbate M., Battaglia C., Remuzzi G.: Renal injury induced by long-term administration of cyclosporine A to rats. *Am J Physiol* 127: 569-579, 1987.
66. Majid D.S., Williams A., Navar L.G.: Inhibition of nitric oxide synthesis attenuates pressure-induced natriuretic responses in anesthetized dogs. *A J Physiol* 264: F79-F87, 1993.