



# *La ciclosporina A inhibe la respuesta de la permeabilidad osmótica al agua a la hormona antidiurética en la vejiga del sapo y a la angiotensina II y hormona antidiurética en piel de sapo*

J. C. Santos, M. Peral de Bruno<sup>1</sup>, S. Jerez y A. Coviello

Fundación INELCO, Facultad de Ciencias Naturales e Instituto Miguel Lillo. <sup>1</sup>Instituto Superior de Investigaciones Biológicas (INSIBIO). Universidad Nacional de Tucumán. Tucumán. Argentina.

## RESUMEN

*El objeto del presente trabajo fue evaluar los efectos de la ciclosporina A (CyA) en la respuesta del flujo osmótico de agua de la vejiga aislada de sapo a la arginina-vasotocina (AVT) y a la angiotensina II (Ang II) y AVT en piel aislada de sapo. La CyA añadida al lado dérmico de la piel aislada de sapo o al lado seroso de la vejiga en concentraciones de 0,42. 10<sup>-6</sup>M a 0,42. 10<sup>-7</sup>M no tuvo efecto en la permeabilidad osmótica basal (Posm) pero inhibió la respuesta hormonal a la AVT en ambas membranas (AVT 10<sup>-10</sup>M en vejiga de sapo y 10<sup>-8</sup> a 10<sup>-9</sup>M en piel de sapo). La CyA también inhibió la respuesta de la Posm a la Ang II (10<sup>-7</sup>M) en piel de sapo en concentraciones de 0,42. 10<sup>-6</sup>M y 0,42. 10<sup>-7</sup>M. En vejiga de sapo pudo demostrarse que el efecto inhibitorio fue reversible. La CyA en concentraciones de 0,42. 10<sup>-6</sup>M inhibió la respuesta de la Posm en piel de sapo a la teofilina (3,2. 10<sup>-3</sup>M) y al dibutilil AMP cíclico (6,2. 10<sup>-3</sup>M) sugiriendo un efecto distal a la generación de AMP cíclico. Estas respuestas apoyarían la posibilidad de un efecto diurético en el nefrón de los mamíferos.*

Palabras clave: **Ciclosporina A. Hormona antidiurética. Angiotensina II. Permeabilidad osmótica. Vejiga y piel de sapo.**

## CYCLOSPORINE A INHIBITS THE OSMOTIC WATER FLOW RESPONSE OF ISOLATED TOAD BLADDER TO ARGININE-VASOTOCIN AND TO ANGIOTENSIN II AND ARGININE-VASOTOCIN IN ISOLATED TOAD SKIN

## SUMMARY

*The purpose of the present study was to assess the effects of cyclosporine A (CyA) in the osmotic water flow response of isolated toad bladder to arginine-va-*

Recibido: 27-IV-2000.

En versión definitiva: 24-X-2000.

Aceptado: 27-X-2000.

**Correspondencia:** Dr. Alfredo Coviello

Fundación INELCO

Av. Mitre, 35

4000 Tucumán (Argentina)

E-mail: acoviello@tucbbs.com.ar

sotocin (AVT) and to angiotensin II (Ang II) and AVT in isolated toad skin. CyA added to the dermal side of isolated toad skin or to the serosal side of toad bladder in concentrations of 0.42.  $10^{-6}M$  to 0.42.  $10^{-7}M$  had no effect on basal osmotic water permeability (Posm) but inhibited the hormonal response to AVT in both membranes (AVT  $10^{-10}M$  in toad bladder and  $10^{-8}$  to  $10^{-9}M$  in toad skin). CyA also inhibited the Posm response to Ang II ( $10^{-7}M$ ) in toad skin in concentrations of 0.42.  $10^{-6}M$  and 0.42.  $10^{-7}M$ . In toad bladder it could be demonstrated that the inhibitory effect was reversible. CyA in concentrations of 0.42.  $10^{-6}M$  inhibited the Posm response of toad skin to theophylline (3.2.  $10^{-3}M$ ) and to dibutyryl cyclic AMP (6.3.  $10^{-3}M$ ) suggesting an effect distal to the generation of cyclic AMP. These responses would support the possibility of a diuretic effect in the mammalian nephron.

**Key words:** Cyclosporine A. Antidiuretic hormone. Angiotensin II. Osmotic permeability. Toad bladder and skin.

## INTRODUCCIÓN

La ciclosporina A (CyA), una droga inmunosupresora potente que es ampliamente usada, ha mejorado grandemente la sobrevivencia de los pacientes trasplantados<sup>1</sup>. La droga produce hipertensión<sup>2</sup> y tiene efectos nefrotóxicos<sup>3</sup>. Estos efectos están en parte mediados por la liberación de endotelina<sup>4,6</sup> y efectos tóxicos directos en las células tubulares proximales<sup>7,8</sup>. Los efectos renales de la CyA en el transporte tubular incluyen inhibición de la ATPasa- $Na^+$ ,  $K^+$ , el cotransportador  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $2Cl^-$  en células MDCK<sup>9</sup> y estimulación del transporte de  $Na^+$  en la piel aislada de rana<sup>10</sup>. En voluntarios humanos con repleción salina<sup>11</sup> una dosis terapéutica de 12 mg/kg y otra supratéutica de 30 mg/kg administradas por vía oral produjeron en forma aguda un aumento de la presión arterial acompañado por un efecto antidiurético con disminución de la excreción de agua libre. No hubo cambios en la excreción de sodio, filtración glomerular, flujo plasmático renal o niveles plasmáticos de vasopresina sugiriendo un efecto tubular. En experimentos realizados en perros<sup>12</sup> una dosis de 20 mg/kg/día de ciclosporina por vía oral durante 8 días redujo, ante una expansión de volumen con solución salina durante una hora el flujo máximo de orina, la depuración de alguna libre y la excreción fraccional de sodio sin cambios en la filtración glomerular pero con aumento del flujo sanguíneo renal en los animales tratados con ciclosporina.

El propósito del presente trabajo fue evaluar los efectos de la CyA en un modelo funcional del nefrón distal de los mamíferos, la piel y vejiga del sapo<sup>13</sup>. En la piel del sapo la angiotensina II (Ang II) y la arginina vasotocina (AVT, la hormona antidiurética que se encuentra naturalmente en los Anfibios) aumentan la permeabilidad osmótica al agua (Posm)<sup>14</sup> a través

de un receptor común<sup>15,17</sup> acoplado a la producción de AMP cíclico<sup>16</sup> que difiere del receptor de la vejiga en el cual solamente la AVT tiene efecto.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se usaron sapos (*Bufo arenarum*) hidratados por inmersión en agua corriente la noche antes del experimento. Después de la destrucción encefalomedular mediante un estilete se disecó la piel ventral pélvica y se la dividió en dos mitades simétricas que se montaron (con la parte dérmica hacia fuera) en el extremo de tubos plásticos (área de la superficie 1,77 cm<sup>2</sup>) y se los sumergió en un baño de 10 ml de solución de Ringer en la cual se hacía burbujear aire. La superficie epidérmica interna se bañó con la misma solución diluida 1/5 en agua destilada y la Posm se midió gravimétricamente pesando el tubo después de un cuidadoso secado en una balanza (Mettler H10) con una aproximación de 0,1 miligramo. Una de las mitades de la piel quedó como control para observar la respuesta a la Ang II, AVT, teofilina o dibutiril AMP cíclico y la otra mitad como experimental para estudiar el efecto de la CyA en la respuesta a las hormonas y drogas mencionados (fig. 1). Previamente se realizó un período de equilibración de una hora durante el cual los baños se cambiaron dos veces y luego dos períodos control de 20 minutos. A continuación se añadió la hormona o droga a ambas mitades al lado dérmico de la preparación. En la mitad experimental se añadió CyA 10 minutos antes durante el período control previo también al lado dérmico. El efecto de las hormonas y drogas se siguió hasta tres períodos de 20 minutos. Una concentración similar de etanol usada para disolver la CyA se añadió al baño externo de la preparación control.

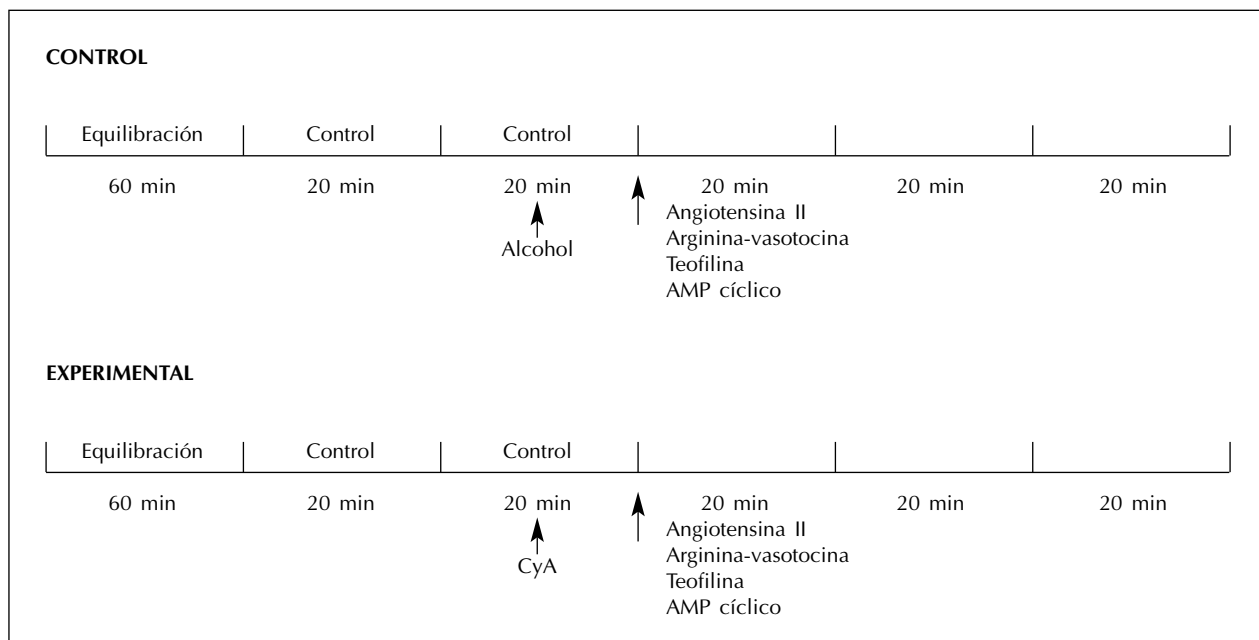


Fig. 1.—Esquema del diseño experimental. CyA, ciclosporina A.

En los experimentos con vejiga, se montaron cada una de las dos hemivejigas en tubos separados con la superficie serosa hacia fuera. El interior fue llenado con 1 ó 2 ml de Ringer diluido 1/5 en agua destilada y la preparación sumergida en un baño de 10 ml de Ringer aerado. Se siguió un protocolo similar al de la piel, quedando una hemivejiga como control y la otra como experimental a la que se añadió CyA. Después de registrar el efecto de la AVT se procedió a lavar la preparación dos veces durante una hora. Se realizó un nuevo período control para verificar el retorno de la permeabilidad basal a los valores previos y se añadió nuevamente AVT a ambas hemivejigas, puede verificar la recuperación de la respuesta hormonal. Este protocolo no pudo ser seguido en piel por la taquifilaxia de la misma a una segunda estimulación con Ang II o AVT.

En piel los resultados se expresan en  $\text{mg}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$  y en vejiga en  $\text{ml}\cdot\text{min}$ . El efecto hormonal (Ang II o AVT) o de la droga (teofilina o dibutil AMP cíclico) fue obtenido entre la diferencia del período después del añadido de la misma y el período control precedente para cada par de piel o hemivejiga. Ambos efectos, uno sin y el otro con el añadido de CyA fueron comparados con test de *t* de Student para muestras pareadas (nivel de significación  $p < 0,05$ ) y los resultados expresados como media y error estándar (E.S.). La solución de Ringer usada contenía

(mM) NaCl 90, KCl 2,  $\text{MgSO}_4$  1,  $\text{CaCl}_2$  1, Tris-HCl buffer 25, glucosa 5; pH 7,4; 220 mOsm/kg  $\text{H}_2\text{O}$ .

*Drogas.* Angiotensina II (angiotensina II de piel de rana) (Ala-Pro-Gly [Ile<sup>3</sup>, Val<sup>5</sup>] angiotensina II, hormona antidiurética (arginina-vasotocina), teofilina y dibutil AMP cíclico fueron obtenidos de Sigma, St. Louis, Mo, USA. La ciclosporina A fue donada por Novartis Pharma AG, Basel, Suiza.

## RESULTADOS

La CyA ( $0,42 \cdot 10^{-6}\text{M}$ ) produjo una inhibición significativa ( $p < 0,01$ ) del 24% en la respuesta de la Posm a la AVT ( $10^{-10}\text{M}$ ) en la vejiga aislada del sapo. Después de una hora de lavado ambas hemivejigas tuvieron una respuesta similar (fig. 2) mostrando una recuperación total de la inhibición. En este tejido la Ang II no tiene efecto en la Posm. La CyA en estas concentraciones no tuvo efecto en la Posm basal en la vejiga (control  $0,1 \pm 0,1$ , experimental  $0,2 \pm 0,2$   $\text{mg}\cdot\text{min}$ , diferencia  $0,1 \pm 0,2$ , N.S.,  $N = 14$ ) y en la piel del sapo (control  $1,2 \pm 3,2$ , experimental  $-4,2 \pm 3,9$   $\text{mg}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ , diferencia  $5,4 \pm 4,1$ , N.S.,  $N = 21$ ).

En la piel aislada del sapo la CyA ( $0,42 \cdot 10^{-10}\text{M}$ ) inhibió significativamente en un 24% a los 20 min ( $p < 0,001$ ) y en un 20% a los 40 min ( $p < 0,01$ )

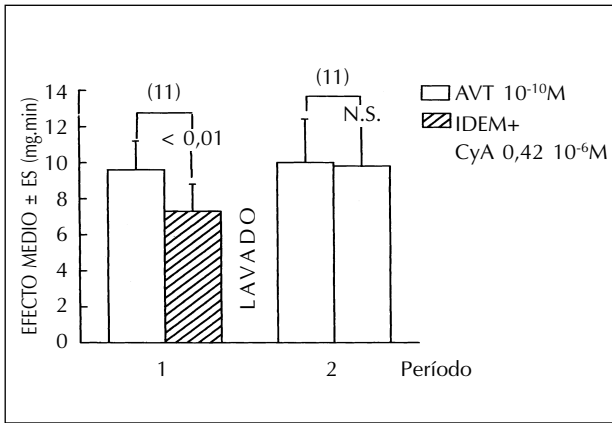


Fig. 2.—Efecto de la ciclosporina A (CyA 0,42. 10<sup>-6</sup>M) en la respuesta de la vejiga aislada del sapo a la hormona antidiurética (AVT 10<sup>-10</sup>M) en la permeabilidad osmótica al agua. Después del lavado la respuesta de ambas hemivejigas fue probada con una concentración similar de AVT en ausencia de CyA. Número de experimentos entre paréntesis.

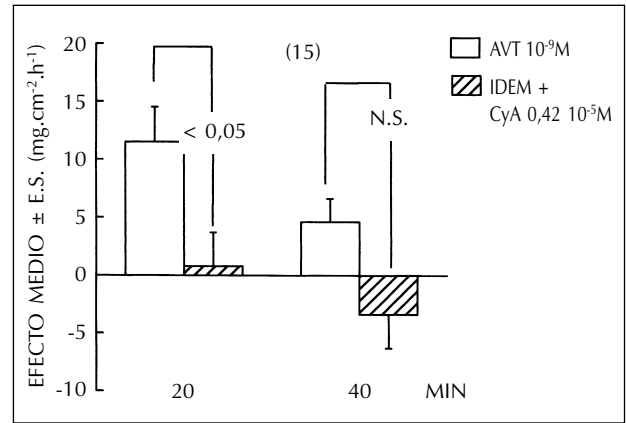


Fig. 4.—Efecto de la ciclosporina A (CyA 0,42. 10<sup>-5</sup>M) en la respuesta de la piel aislada del sapo a la hormona antidiurética (AVT 10<sup>-9</sup>M) en la permeabilidad osmótica al agua. El efecto fue seguido durante dos períodos de 20 minutos. Número de experimentos entre paréntesis.

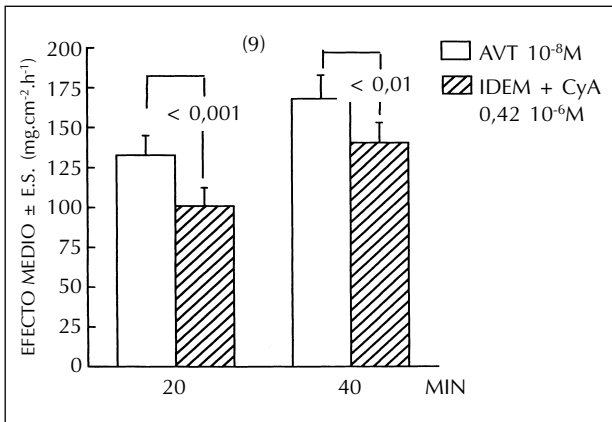


Fig. 3.—Efecto de la ciclosporina A (CyA 0,42. 10<sup>-6</sup>M) en la respuesta de la piel aislada del sapo a la hormona antidiurética (AVT 10<sup>-8</sup>M) en la permeabilidad osmótica al agua. El efecto fue seguido durante dos períodos de 20 minutos. Número de experimentos entre paréntesis.

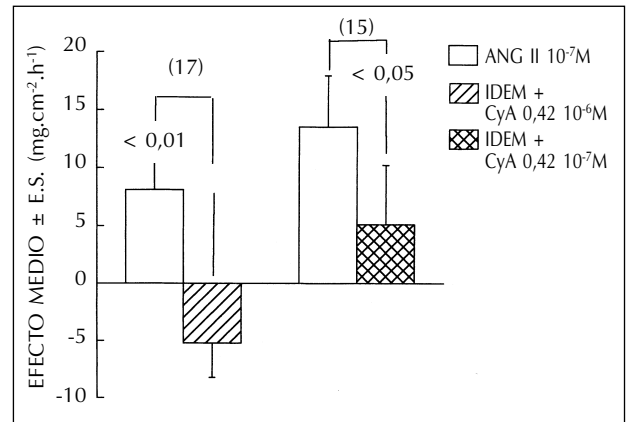


Fig. 5.—Efecto de dos concentraciones de ciclosporina A (CyA 0,42. 10<sup>-6</sup>M y 0,42. 10<sup>-7</sup>M) en la respuesta de la piel aislada del sapo a la angiotensina II (Ang II 10<sup>-7</sup>M) en la permeabilidad osmótica al agua. El efecto fue seguido durante 20 minutos. Número de experimentos entre paréntesis.

el efecto de la AVT (10<sup>-8</sup>M) en la Posm (fig. 3). Una concentración 10 veces superior de CyA (0,42. 10<sup>-5</sup>M) produjo una inhibición del 95% (p < 0,05) de la respuesta de la Posm a una concentración de ACT de 10<sup>-9</sup>M en los primeros 20 min pero en los 40 min siguientes el efecto de la AVT en la mitad control en estas concentraciones disminuyó notablemente y la inhibición no fue estadísticamente significativa (fig. 4).

La respuesta de la Posm en la piel aislada del sapo a la Ang II (10<sup>-7</sup>M) fue completamente inhibida por la CyA a una concentración de 0,42. 10<sup>-6</sup>M, mientras que una concentración diez veces menor de CyA produjo una inhibición menor (62%) pero estadísticamente significativa (p < 0,05) del efecto de la Ang II (fig. 5).

En la piel aislada del sapo la respuesta de la Posm a la teofilina (3,2. 10<sup>-3</sup>M) fue inhibida significativa-

mente por la CyA ( $0,42 \cdot 10^{-6}M$ ) a los 40 min (55%), la inhibición desapareció en el período siguiente de 20 min (fig. 6). La teofilina no tuvo efecto en la Posm en los primeros 20 min.

La respuesta de la Posm de la piel aislada de sapo al dibutiril AMP cíclico ( $6,3 \cdot 10^{-3}M$ ) fue inhibida significativamente a los 20 min en un 72% por la CyA ( $0,42 \cdot 10^{-6}M$ ). La inhibición desapareció en los siguientes 40 min cuando el efecto del AMP cíclico fue mayor (fig. 7).

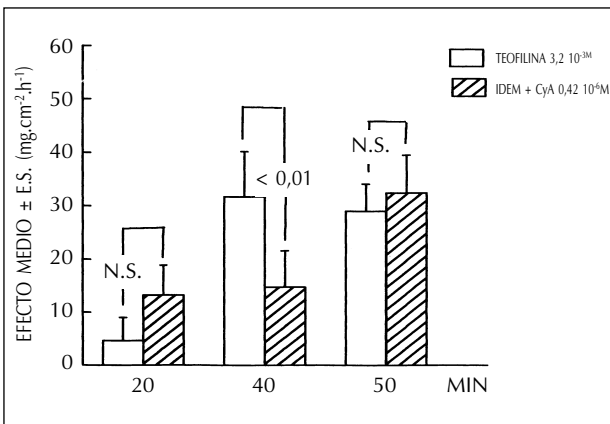


Fig. 6.—Efecto de la ciclosporina A (CyA  $0,42 \cdot 10^{-6}M$ ) en la respuesta de la piel aislada de sapo a la teofilina ( $3,2 \cdot 10^{-3}M$ ) en la permeabilidad osmótica al agua. El efecto fue seguido durante tres períodos de 20 minutos. Número de experimentos entre paréntesis.

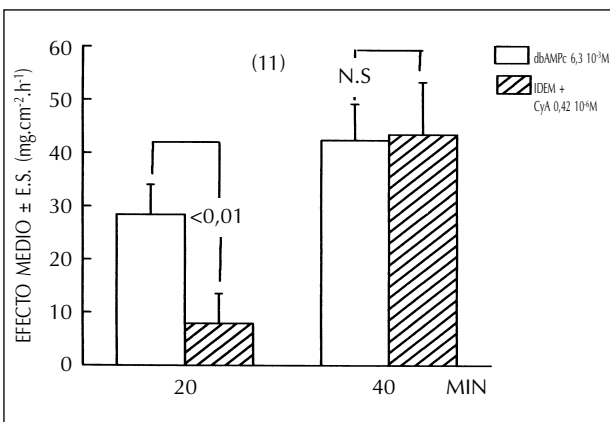


Fig. 7.—Efecto de la ciclosporina A (CyA  $0,42 \cdot 10^{-6}M$ ) en la respuesta de la piel aislada del sapo al dibutiril AMP cíclico (dbAMPc  $6,3 \cdot 10^{-3}M$ ) en la permeabilidad osmótica al agua. El efecto fue seguido durante dos períodos de 20 minutos. Número de experimentos entre paréntesis.

## DISCUSIÓN

Los presentes resultados muestran un efecto inhibitorio de la CyA en la respuesta de la Posm a la AVT en vejiga de sapo y a la AVT y Ang II en piel de sapo. Estos tejidos son un modelo funcional del nefrón distal de los mamíferos<sup>13</sup>. La Ang II estimula la Posm solamente en la piel del sapo a través de un receptor común con la AVT<sup>15,17</sup>. Estos efectos inhibitorios de la CyA en la respuesta hormonal de la Posm en la piel y vejiga de sapo significarían un efecto diurético en el nefrón de los mamíferos. Sin embargo, un efecto antidiurético temprano de la CyA fue comunicado en el hombre<sup>11</sup> y una atenuación de la respuesta diurética a una expansión aguda de volumen en perros<sup>12</sup>. Estas diferencias pueden estar relacionadas a los efectos hemodinámicos de la CyA mediados por la liberación de endotelina<sup>6</sup> en el animal entero.

La concentración de CyA más baja usada ( $0,42 \cdot 10^{-7}M$ ) que produjo una inhibición de la respuesta a la Ang II en piel de sapo, alrededor de  $50 \mu/l$ , es casi la mitad de los niveles terapéuticos usados en los pacientes trasplantados<sup>18</sup>.

En la vejiga de sapo la respuesta a la AVT se recupera rápidamente después de una hora de lavado, por lo tanto, pudo demostrarse la reversibilidad de la acción inhibitoria de la CyA en esta respuesta. En piel de sapo no pudo seguirse este protocolo debido a la falta de respuesta a una segunda estimulación con AVT o Ang II (taquifilaxia).

La CyA en concentraciones de  $5 \cdot 10^{-6}M$ , una concentración casi diez veces mayor a la máxima usada en los presentes experimentos, estimuló el transporte de  $Na^+$  a través de la piel aislada de la *Rana esculenta* a través de la liberación de prostaglandinas ya que este efecto fue inhibido por un bloqueador de la ciclooxigenasa<sup>10</sup>. No se comunicaron efectos en las respuestas hormonales en este tejido.

En células MDCK, un modelo del túbulo distal/tubo colector, la CyA en concentraciones elevadas  $10^{-4}M$  y  $10^{-5}M$  aumentó la resistencia paracelular, lo que puede contribuir a la pérdida de soluto y de agua<sup>19</sup>.

La respuesta de la piel del sapo a la AVT y Ang II es mediada por el AMP cíclico<sup>16</sup>. El AMP cíclico es producido por la adenilatociclasa e inactivado por la fosfodiesterasa. La teofilina inhibe la fosfodiesterasa aumentando los niveles de AMP cíclico y produciendo un aumento de la Posm<sup>20</sup>. Una inhibición de esta respuesta significaría un efecto en la generación de MAP cíclico por la adenilatociclasa. Un efecto inhibitorio de la respuesta de la Posm al AMP cíclico exógeno indicaría una interferencia con los efectos del nucleótido cíclico en la membrana lu-

minal. En nuestros resultados, la CyA produjo inhibiciones transitorias en la respuesta a la teofilina y AMP cíclico sugiriendo efectos después de la generación de AMP cíclico.

La administración crónica de CyA en la rata produjo una reducción de la reactividad presora vascular a la Ang II y norepinefrina, un efecto que puede estar mediado por una interferencia con los canales de calcio<sup>21</sup>. En los presentes experimentos, sin embargo, la inhibición de la respuesta de la Posm a la Ang II y AVT parece estar relacionada al sistema adenilatociclasa-AMP cíclico.

Los presentes resultados muestran por primera vez un efecto inhibitorio de la CyA en la respuesta hormonal de la Posm de la vejiga de sapo a la AVT y de la piel de sapo a la Ang II y AVT, tejidos con propiedades funcionales similares al nefrón distal de los mamíferos.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue subvencionado con subsidios del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) de la República Argentina, P.I.P. 3008 y el Consejo de Investigaciones de la Universidad Nacional de Tucumán (261/106), Argentina.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Kahan BD: Cyclosporine: the agent and its actions. *Transpl Proc* 27 (Supl. 1): 5-18, 1985.
2. Bennet WM, Porter GA: Cyclosporine-associated hypertension. *Am J Med* 85: 131-133, 1988.
3. Koop JB, Klotman PE: Cellular and molecular mechanisms of cyclosporin nephrotoxicity. *J Am Soc Nephrol* 1: 162-179, 1990.
4. Clavell AL, Burnett Jr JC: Physiologic and pathophysiologic roles of endothelin in the kidney. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 3: 66-72, 1994.
5. Haug C, Grill Ch, Schmid-Kotsas A, Gruenert A, Jehle PM: Endothelin release by rabbit proximal tubule cells: modulatory effect of cyclosporine A, tacrolimus, HGF and EGF. *Kidney Int* 54: 1626-1636, 1998.
6. Nassart GM, Badr KF: Endothelin in kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 3: 86-91, 1994.
7. Sokol P, Capodagli LC, Dixon M, Holohan PD, Ross CR, Couldson R, Jones DB: Cyclosporin A and vehicle toxicity in primary cultures of rabbit renal proximal tubule cells. *Am J Physiol* 259: C897-C903, 1990.
8. Takeda M, Kobayashi M, Shirato I, Endoud H: Cyclosporine induces apoptosis of mouse terminal proximal straight tube cells. *Nephron* 80: 121-122, 1998.
9. Deppe CE, Heering PJ, Tinel H, Kinne-Saffran E, Grabensee B, Kinne RK: Effect of cyclosporine A on Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/2Cl<sup>-</sup> cotransporter and H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase in MDCK cells and two subtypes CT and C11. *Exp Nephrol* 5: 471-489, 1997.
10. Lippe C, Bellantuono V, Quaranta A, Castronuovo G, Casano G, Ardizzone C: Cyclosporin A stimulates Na<sup>+</sup> transport across the isolated skin of *Rana esculenta* *Arch Physiol Biochem* 105: 596-602, 1997.
11. Sturrock ND, Lang CC, Struthers AD: Cyclosporin-induced hypertension precedes renal dysfunction and sodium retention in man. *J Hypertens* 11: 1209-1216, 1993.
12. Ciresi DL, Lloyd MA, Sandberg SM, Heublein DM, Edwards BS: The sodium retaining effects of cyclosporine. *Kidney Int* 41: 1599-1605, 1992.
13. Dicker SE: The skin and bladder of amphibians as models for the mammalian nephron. *Hormones* 1: 352-363, 1970.
14. Coviello A, Brauckmann ES: Hydrosmotic effect of angiotensin II: isolated toad skin. *Acta Physiol Latinoam* 23: 18-25, 1973.
15. Peral de Bruno M, Romano L, Coviello A: Interaction between antagonists of angiotensin II and antidiuretic hormone in isolated toad tissues. *Comp Biochem Physiol* 113A: 307-314, 1996.
16. Coviello A, Raisman R, Elso G, Orce G: Role of cyclic AMP and angiotensin III in the response of toad skin to angiotensin II. *Biochem Pharmacol* 27: 611-612, 1978.
17. Peral de Bruno M, Romano L, Coviello A: El losartán inhibe el efecto de la hormona antidiurética en un modelo funcional de nefrón distal. *Rev Argen Cardiol* 65 (Supl. III): 35-38, 1997.
18. Danovitch GM: Immunosuppressive medications and protocols for kidney transplantation. In: Danovitch GM (ed). *Handbook of kidney transplantation* 2<sup>nd</sup> Edition, Boston: Little, Brown and Company, 88, 1996.
19. Zimmerhackl LB, Mesa H, Kramer F, Kohmel C, Wiegeler G, Brandis M: Tubular toxicity of cyclosporine A and the influence of endothelin-1 in renal culture models (LLC-PK1 and MDCK). *Pediatr Nephrol* 11: 778-783, 1997.
20. Orloff J, Handler JS: The similarity of effects of vasopressin, adenosine 3'-5'-phosphate (cyclic AMP) and theophylline on the toad bladder. *J Clin Invest* 41: 702-709, 1962.
21. Textor SC, Smith-Powell L, Telles T: Altered pressor responses to NE and ANG II during cyclosporin administration to conscious rats. *Am J Physiol* 258: H854-H860, 1990.