

# NEFROTOXICIDAD RENAL POR CICLOSPORINA A EN RATAS CONTROLES Y DIABÉTICAS. EFECTO DE LA INSULINA

Dres. Orlando L. Catanzaro<sup>1,2</sup>, Emilio S. Labal<sup>1</sup>, Damián Dziubecki<sup>1</sup>,  
Pablo Obregón<sup>2</sup>, Ricardo R. Rodríguez<sup>2</sup>

## ULTIMA PRUEBA

### RESUMEN

**Introducción:** algunos estudios han demostrado que el tratamiento con ciclosporina A (CsA) iniciado tempranamente en la diabetes se asocia con una disminución de los requerimientos de insulina. No obstante, los beneficios de este tratamiento aún no han sido claramente establecidos. En el presente trabajo, se analiza el efecto de la CsA en ratas diabéticas y controles inyectadas con CsA y su dependencia de insulina (I) en la nefrotoxicidad.

**Materiales y métodos:** ratas Wistar machos fueron divididos en controles y diabéticas (65 mg/kg). Las ratas controles y diabéticas fueron tratadas con 25 mg/kg de CsA durante 30 días. A un grupo de ratas diabéticas se les inyectó 2 U/día de I por 10 días y se continuó con 0,5 U/día por 20 días más; a otro grupo de ratas diabéticas se las trató con CsA y las mismas dosis de I en tiempos iguales. Se realizaron las siguientes determinaciones: glucemia, ingesta de agua, diuresis, calicreína (cal), proteínas (P) y creatinina urinaria (CU).

**Resultados:** en ratas controles, la CsA no modificó las glucemias, pero aumentó la ingestión de agua, diuresis y Cal, P y CU. En los animales diabéticos se observó aumento de la glucemia, agua ingerida, diuresis, CU y P

urinarias, con disminución de Cal urinarias. Cuando los animales diabéticos fueron inyectados con I (2 U/día) se observó una disminución de las glucemias a los 10 y 30 días, con caída en la ingestión de agua y diuresis, y valores normales de Cal y P, en tanto que en los diabéticos más 0,5 U/día de I, aumentaron los valores de glucemias como así también de agua ingerida, diuresis, Cal y P urinarias. Las ratas diabéticas con CsA mostraron un significativo aumento de las glucemias, agua ingerida, diuresis, Cal y P. Cuando las ratas diabéticas más CsA fueron inyectadas con I (2 o 0,5 U/día), las glucemias descendieron a valores normales con ambas dosis a los 10 o 30 días. Si bien ambas dosis de I disminuyeron el 56% el agua ingerida y el 54% la diuresis, no alcanzaron los valores normales. También la actividad de Cal, P y CU estuvo significativamente aumentada.

**Conclusiones:** los resultados observados muestran un crítico deterioro renal en ratas controles y diabéticas tratadas con CsA. A pesar de que la disminución de los requerimientos de I de 2 a 0,5 U/d redujo la glucemia a valores normales, el efecto de la CsA provocó un significativo deterioro de la función renal.

**Palabras clave:** ciclosporina, diabetes, calicreína, proteínas, insulina.

### SUMMARY

**Introduction:** Several studies have demonstrated that CsA treatment started early in diabetic state is associated with a decrease of insulin (I) dependence. Nevertheless, the sustained benefits of CsA treatment are not clearly

<sup>1</sup> Escuela de Odontología y Bioquímica, Universidad Argentina John F. Kennedy

<sup>2</sup> Escuela de Odontología y Medicina, USAL

Dr. Orlando L. Catanzaro

Universidad Del Salvador, Facultad de Medicina. Laboratorio de diabetes

Tucumán 1845, piso 9° (1050) Buenos Aires

established. The present studies were performed to analyze the effect of CsA in diabetic rats and the I dependence on renal nephrotoxicity.

**Materials and methods:** male Wistar rats were divided in Controls and diabetics. Control rats were treated with CsA (25 mg/kg) during 30 days. A diabetic group was treated with I (2 U for 10 d and followed by 0.5 U/d for 20 d more). Another diabetic group was injected with CsA and the same dose of I and time. The following determinations were performed: glycemias, water intake, diuresis, kallikrein (K), protein (P) and urinary creatinine (UC).

**Results:** the effect of CsA did not modified the blood glycemia values in control rats, but increased the water intake, diuresis and UC, K and P. When the diabetic animals were injected with 2 U/d of I, a decrease of glycemia at 10 or 30 d were observed, with a fall in water intake, diuresis and normal values of K, P and UC, meanwhile in the diabetic rats with 0.5 U/d of I increase the glycemia values and water intake, diuresis, K and P. The diabetic rats plus CsA showed a significant increase of glycemias, water intake, diuresis, K and P. CsA diabetic rats injected with I 2 or 0.5 U/d shown a decrease of glycemia to normal values at 10 and 30 d. Though both dose of I decreased 56% the water intake and 54% the diuresis did not reach the control values. Neither the urinary K, P and UC were significant decreased.

**Conclusions:** the results obtained shown a critical renal damage in control and diabetic treated rats with CsA during 30 days. Nevertheless the decrease of I requirements (2 to 0.5 U/d) reduced the blood glycemias to normal values, the effect of CsA produced a significantly impairment in renal function.

**Key words:** cyclosporine, diabetes, kallikrein, protein, insulin.

## INTRODUCCIÓN

La diabetes tipo 1 es causada específicamente por la disminución y/o pérdida de las células secretoras de insulina a través de un mecanismo por el cual la autoinmunidad a los islotes pancreáticos juega un rol importante<sup>1</sup>. Se han propuesto procedimientos para bloquear la auto-

inmunidad por medios efectivos para prevenir la enfermedad diabética, especialmente en aquellos individuos identificados como de riesgo. De acuerdo con algunos autores, se ha demostrado que la inmunosupresión por CsA puede reducir los requerimientos de insulina y aumentar la función endógena de las células  $\beta$  en pacientes con diabetes tipo 1<sup>2,3</sup>. Sin embargo, no todos los pacientes diabéticos se han beneficiado con el tratamiento de inmunosupresores, lo que demuestra, en algunos casos, que el tratamiento con CsA induce serias complicaciones renales<sup>4</sup>. El empleo potencial de CsA en la prevención del rechazo de órganos trasplantados está limitado por la aparición de importantes efectos colaterales, como por ejemplo, la nefrotoxicidad. La disfunción renal puede ocurrir en cualquier momento y se manifiesta como un daño funcional temprano reversible, o una complicación tardía e irreversible del funcionamiento renal. Numerosos estudios han analizado el funcionamiento renal en humanos diabéticos y en animales controles inyectados con CsA<sup>5,6</sup>. Por otra parte, los trabajos realizados han demostrado que el sistema calcitrina-cininas urinarias participa activamente en el estado diabético<sup>7,8</sup>. Sin embargo, los mecanismos precisos del efecto de la CsA en beneficio del estado diabético y sus complicaciones renales no han sido extensivamente caracterizados. El presente estudio experimental examina el efecto de la CsA sobre la función renal de ratas controles y diabéticas, la dependencia de insulina en el estado diabético y la nefrotoxicidad por CsA.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Ratas Wistar machos (200-250 g) fueron inyectadas con 65 mg/kg de estreptozotocina (STZ). Se analizaron los siguientes grupos de ratas (6 a 8 por grupo): 1) Controles; 2) Controles más CsA (25 mg/kg); 3) Diabéticas; 4) Diabéticas más 2 U/día de insulina durante 10 días, continuando con 0,5 U/día por 20 días más; 5) Diabéticas más CsA; 6) Diabéticas más CsA e insulina (2 o 0,5 U/día por 10 o 20 días). Los grupos de ratas diabéticas más I y diabéticas más CsA e I se colocaron en jaulas metabólicas con agua medida y recolección de orina a

los 10 y 20 días posteriores, durante 8 horas. Los grupos controles y controles más CsA se colocaron en jaulas metabólicas a los 30 días durante 8 horas con agua medida y recolección de muestras. Los procedimientos y protocolos para el uso de animales estuvieron de acuerdo con las regulaciones de la USAL.

## ANÁLISIS BIOQUÍMICOS

Las glucemias fueron determinadas antes de inyectar con STZ y 48 h, 10 y 30 días después de STZ mediante tiras reactivas medidas en un glucometro (Roche). Las creatininas urinarias fueron determinadas mediante un kit (Wiener lab).

Determinación de calicreína urinaria: la calicreína urinaria se determinó mediante un sustrato cromogénico (S 2266, Chromogenic, Italia). Las muestras de orina fueron centrifugadas durante 10 min. y filtradas en Sephadex-G25. Se incubaron alícuotas de orina (50-100 ul) 37 °C con 1 mM de p-Val-Leu-Arg paranitroanilina, Tris 9,5 pH durante 60 min. La reacción fue frenada con ácido acético al 50%. Después de centrifugar, las muestras fueron leídas a una DO de 405 nm. La actividad de la calicreína está determinada por el aumento de liberación de p-NA y es proporcional a la actividad enzimática de calicreína obtenida desde una curva Standard de p-nitroanilina (p-NA) y calculada por mg de creatinina. La concentración de proteínas fue determinada por el método de Bradford<sup>9</sup>.

## RESULTADOS

### Efectos de la CsA en ratas controles

En ratas inyectadas durante 30 días con CsA no hubo modificaciones de las glucemias, pero se observaron aumentos del 68,7% de creatininas urinarias, del 174,5% de agua consumida y una diuresis del 36,7% respecto de controles ( $P < 0,05$ ) (Tabla I y II). Los valores de calicreína urinaria también sufrieron un significativo aumento respecto de controles ( $25 \pm 1,2$  vs.  $17,3 \pm 2$ )  $\mu\text{mol pNA/mg creatinina}$  ( $P < 0,05$ ) (Fig. 1.A). Similares resultados se observaron en la excreción de proteínas (Fig. 2.A).

**Tabla I.** Concentraciones de glucosa y creatinas urinarias en ratas. Controles, diabéticas, diab. más CsA (25 mg/kg) durante 30 días. Las ratas diabéticas más I y diab. más CsA e I (2 y .5U día fueron tratadas durante 10 y 20 días respectivamente

	Glucemias (mM/L)	Creatininas (mg/8h)
Control	5,9 ± 0,9	0,48 ± 0,12
Control + CsA	6 ± 1,2	0,81 ± 0,09*
Diabético	19,1 ± 1,2*	1,7 ± 0,8
D + I (2U)	6,1 ± 1,3	0,52 ± 0,07
D + I (0,5U)	13,5 ± 2,7	0,63 ± 0,10*
D + CsA	17,2 ± 1,7	1,9 ± 0,12
D + CsA + I (2U)	7 ± 1,2	1,4 ± 0,18
D + CsA + (0,5U)	8,1 ± 1,5*	1,3 ± 0,20*

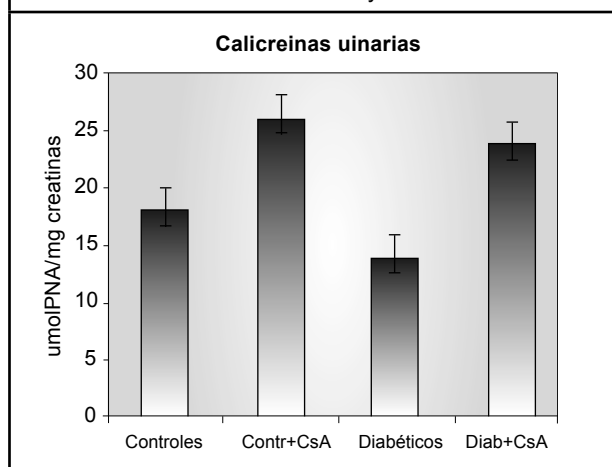
(N=6-8 ratas). Valores expresados en media ± ES ES \* $P < .05$  vs. controles y diabéticos

**Tabla II.** Efecto de CsA en ratas controles y diabéticas con I p CsA más I sobre el consumo de agua y diuresis

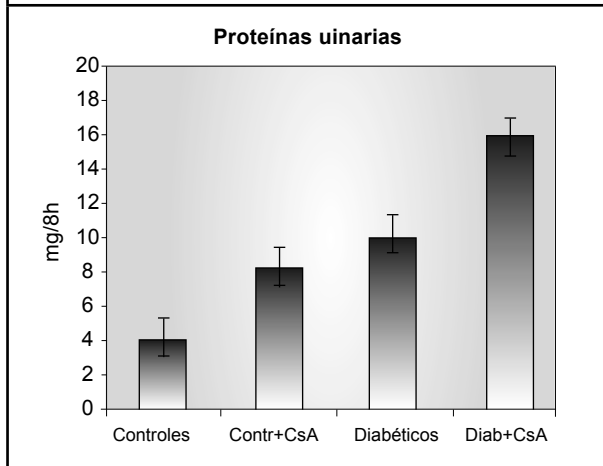
	Agua consumida (ml/8h)	Vol. urinario (ml/8 h)
Control	5,5 ± 0,8	6,3 ± 1,3
Control + CsA	15,1 ± 1,3*	9,3 ± 2,4
Diabético	30,1 ± 3,2*	24,8 ± 2,3*
D + I (2U)	6,5 ± 1,2	8,9 ± 0,09
D + I (0,5U)	12,5 ± 1,4*	14,5 ± 2,1
D + CsA	48,3 ± 3,1	37,1 ± 3,2*
D + CsA + I (2U)	21,3 ± 2,7*	17,4 ± 1,7*
D + CsA + (0,5U)	22,4 ± 3,6	19 ± 2,9*

(N=6-8 ratas). Valores expresados en media ± ES ES \* $P < .05$  vs. controles y diabéticos

**Figura 1 A.** Efecto del tratamiento con CsA (25 mg/kg) en ratas controles y diabéticas sobre la excreción de calicreína urinaria. Los datos están expresados en ES+/- de la media,  $P < 0,05$  Controles y diabéticos con CsA vs. controles y diabéticos



**Figura 2 A.** Efecto del tratamiento con CsA (25 mg/kg) en ratas controles y diabéticas sobre la excreción urinaria de proteínas. Los datos están expresados en ES +/- de la media,  $P < 0,05$ .



### Efectos de la insulina en ratas diabéticas

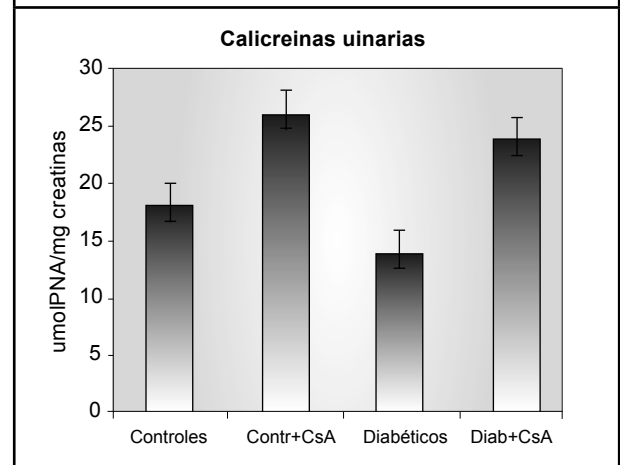
Los valores de glucemias en ratas diabéticas fueron significativamente mayores respecto de los controles ( $19,1 \pm 1,2$  vs.  $5,9 \pm .9$  mM/L ( $P < 0,05$ ). El tratamiento con 2 U/d de insulina redujo los valores de glucemias el 68,1% respecto de las diabéticas a los 10 días, pero cuando se continuó hasta los 30 días con 0,5 U/d las glucemias se redujeron solo el 29,4%. Cuando se compararon con controles, los valores fueron del 3,7% con 2 U/día y del 128,8% con 0,5 U/día. Los valores de creatinina no se modificaron significativamente. El volumen de agua consumida y diuresis mostraron aumentos significativos respecto de los controles (447% y 264% respectivamente), con significativa disminución con 2 U/d de insulina durante 10 días ( $6,5 \pm 1,2$  ml/8 h) y con un aumento del 127,2% con 0,5 U/d a los 20 días. Similares resultados se obtuvieron en las diuresis (Tabla I y II). La actividad de la calicreína urinaria mostró una significativa disminución respecto de los controles, en tanto que la excreción de proteínas aumentó significativamente ( $P = 0,05$ ) (Figs. 1.A y 2.A).

### Efecto de la CsA e insulina en ratas diabéticas

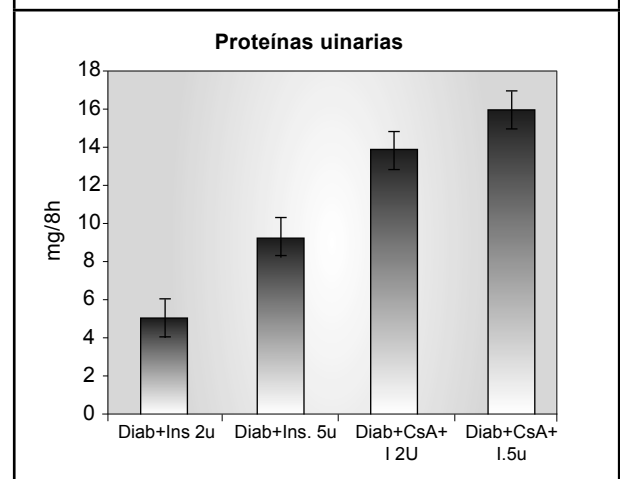
Cuando a las ratas diabéticas se las trató con CsA, las glucemias y las creatininas se mantuvieron significativamente altas ( $P < 0,05$ ). El tratamiento con insulina (2 o 0,5 U/d) en ratas diabéticas mostró una significativa disminución

de las glucemias con ambas dosis en la continuidad del tratamiento ( $7 \pm 1,2$  y  $8,1 \pm 1,5$  mM/L) con significativo aumento de creatinina urinaria ( $1,41 \pm .18$  y  $1,39 \pm .20$  mg/8 h). Respecto al agua consumida y diuresis, el efecto de la CsA en animales diabéticos produjo un aumento 8 veces mayor respecto de los controles y 1,6 respecto de diabéticas, en tanto que la diuresis aumentó 6 veces respecto de los controles y 1,4 respecto a diabéticas (Tablas I y II).

**Figura 1 B.** Efecto del tratamiento con CsA sobre la excreción de calicreína urinaria en ratas diabéticas y diabéticas con CsA inyectadas con insulina (2 U/día por 10 días) y a continuación 5 U/día por 20 días. Los datos están expresados en ES +/- de la media,  $P < 0,05$ .



**Figura 2 B.** Efecto del tratamiento con CsA sobre la excreción de proteínas urinarias en ratas diabéticas y diabéticas con CsA inyectadas con insulina (2 U/día por 10 días) y a continuación con 5 U/día por 20 días. Los datos están expresados en ES +/- de la media,  $P < 0,05$ .



La actividad de la calicreína urinaria y las proteínas aumentó significativamente por el efecto de la CsA (Figs. 1.A y 1.B), tanto en controles como en diabéticas. Los valores de agua consumida y diuresis en ratas diabéticas más CsA tratadas con insulina 2 o .5 U/d de insulina escasamente disminuyeron la ingestión de agua (56 y 54% con ambas dosis) con valores similares en las diuresis (Tablas I y II). La actividad enzimática de la calicreína como así también la de la proteína urinaria mostraron un significativo aumento con ambas dosis de insulina ( $P < 0,05$ ) (Figs. 1.B y 2.B).

### Análisis estadístico

Los datos fueron expresados como la media  $\pm$  DE. Las diferencias fueron analizadas por el test de la *t* de Student para datos no apareados y análisis de varianza (ANOVA). Las diferencias fueron consideradas significativas a valores de  $P < 0,05$ .

### DISCUSIÓN

En el presente estudio experimental, hemos demostrado que el tratamiento con CsA en la enfermedad diabética temprana, si bien disminuye la dependencia de la insulina con una significativa reducción de la hiperglucemia diabética, produce nefrotoxicidad progresiva. La ciclosporina es un potente inmunosupresor que está asociado al desarrollo de hipertensión y nefrotoxicidad<sup>6</sup>. Algunos estudios han demostrado que la administración de CsA produce disminución del flujo renal y filtración glomerular, con deterioro en la secreción de urea y disfunción tubular<sup>10</sup>. Por otra parte, se ha demostrado que el tratamiento con CsA iniciado tempranamente en la diabetes se asocia con una posible disminución de la dependencia de insulina (5 Rodier). En el presente estudio, hemos demostrado que el tratamiento con CsA produce importantes modificaciones del funcionamiento renal, con alteraciones en la excreción de creatinina y calicreína, y aumento de la proteinuria. El efecto de la CsA aumenta la ingestión de agua y la diuresis, y condiciona al riñón para aumentar la actividad del sistema calicreína-cinina, por lo que el elevado nivel de

calicreína renal podría contribuir a producir el efecto diurético del inmunosupresor<sup>6</sup>. Debido a que las cininas son natriuréticas/diuréticas y vasodilatadores, el aumento de calicreína urinaria observado en nuestro modelo podría sugerir una sobrerregulación de la producción del sistema calicreína-cininas renales para compensar la actividad vasoconstrictora de la CsA. Es un hecho conocido que la diabetes afecta la actividad renal. En trabajos realizados en ratas diabéticas y humanos se ha demostrado una disminución de la actividad de la calicreína urinaria<sup>7, 8</sup>, en tanto que en ratones diabéticos se ha demostrado un aumento de la actividad de la calicreína urinaria<sup>11, 12</sup>. Un efecto importante pudo ser analizado en ratas diabéticas inyectadas con CsA e insulina. Con una dosis de insulina de 2 U/día durante 10 días, se observó una disminución de la hiperglucemia diabética; cuando se redujo la dosis a la cuarta parte, el efecto sobre la disminución de la hiperglucemia diabética se sostuvo 20 días. Sin embargo, ninguna de las dos dosis de insulina redujo la nefrotoxicidad de la CsA. De acuerdo con los trabajos de Christie y cols.<sup>13</sup> la CsA tiene un débil efecto sobre los niveles de IA-2 A y GADA, pero tiene significativos efectos inhibitorios sobre ICA y los anticuerpos de insulina<sup>14</sup> que se desarrollan después de iniciar la terapia con insulina<sup>15</sup>. La CsA no tiene efecto sobre la secreción de insulina y el péptido C en pacientes que son positivos a IA-2 A pero negativos a GADA<sup>13</sup>. El efecto de corta duración de la CsA, por otra parte, produce una disminución del sistema calicreína-cininas y de la expresión del receptor para bradicininas B2 en tejido renal<sup>16</sup>. Se han podido observar otras manifestaciones de nefrotoxicidad en la prevención del rechazo agudo del riñón trasplantado. En estos casos, el uso de bajas dosis de CsA no elimina la nefrotoxicidad temprana<sup>17, 18</sup>. Por otra parte, la expresión de p-glicoproteínas disminuye en pacientes trasplantados y tratados con CsA, como un signo temprano de alta nefrotoxicidad<sup>19</sup>.

En conclusión, los resultados de este estudio experimental demuestran que:

- 1) La administración crónica de CsA en ratas normales no afecta la glucemia, pero sí afecta la función renal.

2) En ratas diabéticas tratadas con CsA e insulina, se observa una disminución significativa de la hiperglucemia y depen-

dencia de insulina de 2 a 0,5 U/día, pero no atenúa la nefropatía producida por el inmunosupresor.

## REFERENCIAS

1. Christie MR. Islet proteins implicated in pathogenesis of type 1 diabetes. *Adv Mol Cell Biol* 1999; 29:75-100.

2. The Canadian-European Randomized Control Trial Goup: Cyclosporin-induced remission of IDDM after early intervention: association of 1 year of cyclosporine treatment with enhanced insulin secretion. *Diabetes* 1988; 37:1574-1582.

3. Bougneres PF, Carel JC, Castano L, Gardin JP, Landais P, Hors J, Mihatsch MJ, Paillard M, Chausain JL, Bach JF. Factors associated with early remission of type 1 diabetes in children treated with cyclosporine. *N Engl Med* 1988; 318:663-670.

4. Keown PA, Stiller CR, Wallace AC. Effect of cyclosporine on the kidney. *J Pediatr* 1987; 11:1029-1033.

5. Rodier M, Ribstein J, Parer-Richard C, Mimran A. Renal changes associated with cyclosporine in recent type 1 diabetes mellitus. *Hypertension* 1991; 18:34-340.

6. Wang C, Ford P, Chao C, Chao I, Chao J. Effect of cyclosporine A on the expression of tissue kallikrein, kininogen, and bradykinin receptor in rat. *Am J Physiol* 1997; 273:783-789.

7. Rastelli VM, Olivera MA, dos Santos R, de Cassia Tostes Passaglia R, Nigro D, de Carvalho MM, Fortes ZB. Lack of potentiation of bradykinin by angiotensin(1-7) in a type 2 diabetes model: role of insulin. *Peptides* 2007; 28:1040-1049.

8. Maric C. Vasoactive hormones and the diabetic kidney. *Scientific World Journal* 2008; 8:470-485.

9. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms. Quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72:248-254.

10. Kaye D, Thompson J, Jennings G, Esler M. Cyclosporine therapy after transplantation causes hypertension and vasoconstriction without sympathetic activation. *Hypertension* 1993; 88:1101-1109.

11. Zuccollo A, Dziubecki D, Villareal I, Rodríguez RR, Catanzaro OL. The development of insulinitis and the kal-

likrein-kinin system. *Internat Immunopharmacology* 2002; 2:1941-1947.

12. Vila SB, Peluffo V, Alvarado C, Cresto JC, Zuccollo A, Catanzaro OL. The kallikrein-kinin system in early state of diabetes. *Agents and Actions* 1992; 38:304-310.

13. Christie MR, Molving J, Hawkes CH, Carstensen B, Mandrup-Poulsen T. IA-2 antibody-negative status predicts remission and recovery of C-peptide levels in type 1 diabetic patients treated with cyclosporine. *Diabetes Care* 2002; 25:1192-1197.

14. Mandrup-Poulsen T, Nerup J, Stiller D, Marnier B, Bille G, Heirrichs D, Martell R, Dupre J, Keown PA, Jenner MR, Rodger MW, Wolfe B. Disappearance and reappearance of islet cell cytoplasmic antibodies in cyclosporin-treated insulin-dependent diabetics. *Lancet* 1985; 2:599-602.

15. Christie MR, Roll U, Payton MA, Harfield ECI, Ziegler AG. Validity of screening for individuals at risk for type 1 diabetes by combined analysis of antibodies to recombinant proteins. *Diabetes Care* 1997; 20:965-970.

16. Bompard G, Tack I, Castano EM, Pesquero JB, Girolami JP, Bascands JL. Cyclosporine decreases kallikrein and BK 2 mRNA expression in the rat renal cortex. *Immunopharmacology* 1996; 32:99-101.

17. Ekberg H. Calcineurin inhibitor sparing in renal transplantation. *Transplantation* 2008; 27:761-767.

18. Busauschina A, Schnuelle P, vander Woude FJ. Cyclosporine nephrotoxicity. *Transplant* 2004; 11:S6-12.

19. Yu X, Zhang B, Sun B, Liu M, Zhang W, Gu M. Different effect of cyclosporine and tacrolimus on renal expression of P-glycoprotein in human kidney transplantation. *Transplant Proc* 2008; 40:3455-3459.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a Novartis Argentina S. A. la entrega de ciclosporina A.

Este trabajo fue apoyado por un subsidio de la UAJFK y USAL-AOA.

Nuestro agradecimiento a la Lic. Irene Di Martino por su ayuda técnica y estadística.