

Rosa Maria Cordeiro Soubhia

**Avaliação dos efeitos nefrotóxicos da
associação do tacrolimus (FK 506) e
antiinflamatórios não-hormonais em ratos.**

**São José do Rio Preto
2005**

Rosa Maria Cordeiro Soubhia

**Avaliação dos efeitos nefrotóxicos da
associação do tacrolimus (FK 506) e
antiinflamatórios não-hormonais em ratos.**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
de São José do Rio Preto para obtenção do
Título de Doutor no Curso de Pós-graduação
em Ciências da Saúde, Eixo Temático:
Medicina Interna.

Orientador: Prof. Dr. José Paulo Cipullo

Co-orientador: Prof. Dr. Emmanuel A. Burdmann

**São José do Rio Preto
2005**

Soubhia , Rosa Maria Cordeiro

Avaliação dos efeitos nefrotóxicos da associação do tacrolimus (FK506) e antiinflamatórios não-hormonais em ratos. / Rosa Maria Cordeiro Soubhia.

São José do Rio Preto, 2005

91 p.;

Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP

Eixo Temático: Medicina Interna

Orientador: Prof. Dr. José Paulo Cipullo.

Co-Orientado: Prof. Dr. Emmanuel A .Burdmann

1.Nefrotoxicidade aguda; 2. Tacrolimus (FK 506); 3. Rofecoxib;
4. Diclofenaco sódico; 5. Antiinflamatórios não-hormonais.

Sumário

Dedicatória.....	i
Agradecimentos Especiais.....	ii
Agradecimentos	iv
Epígrafe	ix
Lista de Figuras.....	x
Lista de Tabelas.....	xi
Lista de Abreviaturas e Símbolos.....	xii
Resumo.....	xv
Abstract.....	xvii
1. Introdução	01
1.1. Objetivos	12
2. Materiais e Método.....	13
2.1. Animais e dieta.....	14
2.2. Drogas.....	15
2.3. Protocolo experimental.....	15
2.4. Estudo de filtração glomerular e histologia.....	18
2.4.1. Filtração glomerular (depuração renal de inulina)	18
2.4.2. Estudo histológico	19
2.5. Estudos hemodinâmicos	20
2.6. Análise bioquímica	21
2.7. Análise Estatística	22
3. Resultados.....	23
3.1. Filtração glomerular e volume urinário	24

3.2.	Hemodinâmica renal	25
3.3.	Depuração de solutos	28
3.4.	Histologia	31
3.5.	Peso	35
3.6.	Hematócrito	36
3.7.	Concentração sanguínea de FK 506.....	36
4.	Discussão	38
5.	Conclusões.....	52
6.	Referências Bibliográficas	54
7.	Apêndices.....	78

- ✓ Aos meus queridos Gilberto, Maria Luiza e Gil, pela compreensão nos momentos em que estive ausente e pelo carinhoso apoio, valorizando o meu trabalho com palavras e atitudes e me incentivando na busca de realização pessoal e profissional.

- ✓ Aos meus pais Luiz Carlos e Norma, pela oportunidade da vida e a chance de desenvolvimento espiritual que me proporcionaram, conduzindo com amor e sabedoria cada etapa de minha vida.

Agradecimentos Especiais

- ✓ Aos meus orientadores

Professor Cipullo:

A humildade e a paciência são as principais qualidades do ser humano. Conseguir praticá-las faz parte do exercício da vida, mas nem todos conseguem vivenciá-las em sua plenitude. A sabedoria consiste justamente na convivência do poder com a humildade e a paciência. Desde os tempos de acadêmica, como sua aluna por ocasião de minha formação e agora como pós-graduanda tendo o senhor como meu orientador, reconheço essas qualidades em sua atuação como professor, profissional e pessoa, por isso sempre o admirei. É uma honra ter feito esse trajeto profissional a seu lado, e sempre procurei me espelhar em seu exemplo. Tenho dificuldades em escolher as palavras que traduzam a melhor forma de agradecer ao senhor a paciência com que me ajudou a conduzir todo o trabalho e a forma com que tirou minhas dúvidas. Então chego à conclusão de que o velho chavão “muito obrigada” e as palavras “meu eterno agradecimento” refletem a continuidade desse reconhecimento.

Agradecimentos Especiais

Professor Burdmann:

Somos contemporâneos de formação, sua curiosidade e espírito científico o encaminharam desde cedo à ciência experimental. Esse dom é raro, poucos o têm. Que orgulho para esta escola médica recebê-lo como professor, pesquisador e coordenador da pós-graduação. Foi sob sua orientação que vivenciei a pesquisa experimental e conheci a dimensão e a importância da mesma para a ciência. Desenvolvi meu trabalho com tranquilidade, pois as orientações foram sempre precisas. Com a delicadeza dos sábios, você soube dizer sempre palavras de incentivo e elogios, que me deram firmeza e motivação para a realização da minha pesquisa. A simplicidade e a praticidade com que ensina fazem os assuntos, por mais árduos que sejam, produzirem a sensação “o sabor do saber”. Muito obrigada pela disponibilidade de tempo e atenção, que, pode ter certeza, foram preciosos para o meu crescimento. Espero poder retribuir sempre, com carinho e consideração, nas ocasiões em que nossos caminhos profissionais se cruzarem.

Agradecimentos

- ✓ Ao Prof. Dr. José Victor Maniglia, Diretor Geral da FAMERP, pelo incentivo à pós-graduação, consolidando as medidas implantadas pelos seus antecessores e, com espírito empreendedor, garantindo a excelência do ensino praticado nesta Escola.
- ✓ Ao Prof. Dr. Domingo Marcolino Braile, Diretor Adjunto da Pós-graduação da FAMERP e ao Prof. Dr. Moacir Fernandes Godoy, Coordenador do Eixo Temático Medicina Interna, pela dedicação e apoio à pós-graduação.
- ✓ Ao Prof. Dr. Reinaldo Azoubel, Coordenador Geral da Pós-graduação, pelo incentivo e dedicação à FAMERP.
- ✓ Ao Prof. Eduardo Paulo Boskovitz, que me mostrou a magnificência do trabalho com a coletividade que norteou os primeiros passos da minha vida profissional, e acredito ser, hoje, o diferencial no meu trabalho.
- ✓ Ao Prof. Sylla Pardo, que mostrou os meandros da saúde como pratica no setor publico, incentivando meu trabalho na rede publica e dentro desta escola, no ensino da saúde coletiva.
- ✓ À Profa. Dra. Dirce Maria Trevisan Zanetta, pelo incentivo e apoio no momento de mudanças em minha vida profissional; suas palavras foram o impulso de que eu precisava.

Agradecimentos

- ✓ Ao Prof. Dr. João Roberto Antônio, que me conduziu com carinho e dedicação para o conhecimento do maravilhoso universo da pele, proporcionando a oportunidade de fazer parte de sua equipe, o que muito me orgulha, incentivando sempre a pesquisa e a realização do trabalho com amor e ética.
- ✓ À Profa. Glória Elisa Florido Mendes, por sua colaboração e incentivo, mostrando-me com dedicação e esmero as atividades da cirurgia experimental e testes laboratoriais, proporcionando segurança na condução do meu trabalho no Laboratório de Fisiopatologia Renal.
- ✓ Ao Sr. Pedro José de Freitas, técnico responsável pelo Biotério e aos funcionários Edna Maria Gracioli, Luzia da Silva Viana, Florentino Damaceno de Oliveira Junior e Walter Camarin, pelo apoio, incentivo e dedicação no trabalho com os animais.
- ✓ À Francine Zocoler Mendonça, bióloga estagiária do Laboratório de Fisiopatologia Renal, pela colaboração nos cuidados com os animais e realização dos exames laboratoriais.
- ✓ À Profa. Dra. Sueli Suzigan e funcionários do Laboratório de Histologia, Srs. Domingos Zanchetta Netto e Zanclayr Alves Santana, pelo apoio e colaboração na confecção das lâminas.

Agradecimentos

- ✓ À Profa. Dra. Maria Alice Sperto Baptista, pela colaboração na leitura e laudos dos exames anatomopatológicos.
- ✓ Ao Sr. Milton Dorival Pires e Sra. Maria Rogéria Prado, biomédicos responsáveis pelo Setor de Sorologia e Imunologia do Laboratório Central do HB, pela realização das dosagens de FK 506.
- ✓ Ao Prof. João Vicente de Paiva Netto, Professor de Farmacologia e Coordenador do Biotério, pelo apoio e informações sobre os animais e drogas que muito auxiliaram no desenvolvimento do meu trabalho.
- ✓ Aos funcionários da pós-graduação Fabiana Cristina Godoy, José Antônio Silistino e Guilherme Martins Dias, pelo apoio e atenção nas atividades administrativas, garantindo com destreza os prazos e documentos e incentivando, com elogios, o desenvolvimento do meu trabalho.
- ✓ À funcionária da pós-graduação Rosimeire Cleide Souza Desidério, pelo apoio administrativo e de informática, que muito auxiliou na composição e arte final do meu trabalho.

Agradecimentos

- ✓ Ao Luiz Henrique Ferreira e Edílson Solim, funcionários do Núcleo de Apoio Pedagógico da FAMERP, pelo apoio e capricho com que me auxiliaram nas questões de informática necessárias ao meu trabalho.
- ✓ À amiga Livia Cais Burdmann, pela versão do resumo em Inglês e pelo estímulo com palavras de apoio, que me deram segurança e foram importantes em algumas etapas do meu trabalho.
- ✓ Ao professor de Língua Portuguesa Adalmir Rodrigues Castro, pela correção ortográfica.
- ✓ Às colegas da Disciplina de Dermatologia, Docentes e Residentes, pelo apoio e colaboração, nos momentos em que precisei me ausentar.
- ✓ Às funcionárias do Ambulatório de Dermatologia, Deusimara Fagundes de Souza, Fabiana Gianini Jardim e Roberta Zanatta de Fáveri, pelo apoio no trabalho do dia-a-dia, sempre com sorrisos mesmo nos momentos mais tensos por que passei.
- ✓ À secretária do Departamento de Medicina, Elisabeth Rodrigues Reis Zago, pelas palavras de incentivo nas ocasiões de discussão do trabalho com o Chefe do Departamento de Medicina, meu orientador Prof. Dr. José Paulo Cipullo.

Agradecimentos

- ✓ À amiga Profa. Dra. Vânia Del'Arco Paschoal, pelo carinho e amor com que me atendeu nos momentos de excesso de trabalho e de inseguranças, seu apoio foi valoroso.
- ✓ À minha família, pelo incentivo e compreensão pelos momentos em que estive ausente.

MUITO OBRIGADA

A história pertence, em segundo lugar, a quem a conserva e venera, àquele que, com fidelidade e amor, volta seu olhar para o lugar de onde veio e onde se formou. O ponto de vista histórico é tão necessário à saúde de um indivíduo, de um povo, de uma civilização, quanto o ponto de vista anti-histórico.

Nietzche

Lista de Figuras

Figura 1.	Filtração glomerular nos grupos estudados.....	27
Figura 2.	Volume urinário nos grupos estudados.....	27
Figura 3.	Pressão arterial média e resistência vascular renal nos grupos estudados.....	28
Figura 4.	Alterações histológicas nos grupos estudados.....	31
Figura 5.	Corte histológico renal apresentando leves alterações de vacuolização tubular, coloração por Periodic Acid Methenamine Silver (PAMS) X 1000.....	33
Figura 6.	Corte histológico renal apresentando leves alterações de dilatação tubular, coloração por Periodic Acid Methenamine Silver (PAMS) X 400.....	33
Figura 7.	Corte histológico renal apresentando leves alterações degenerativas epiteliais agudas, coloração por Periodic Acid Methenamine Silver (PAMS) X 400.....	34
Figura 8.	Corte histológico renal apresentando leves alterações de necrose tubular aguda, coloração por Periodic Acid Methenamine Silver (PAMS) X 400.....	34
Figura 9.	Variação de peso dos ratos nos grupos estudados.....	35
Figura 10.	Hematócritos dos ratos, nos grupos estudados.....	36
Figura 11.	Concentração sanguínea de FK (CSFK) dos ratos nos grupos estudados.....	37

Lista de Tabelas

Tabela 1.	Comparação dos dados de Ritmo de Filtração Glomerular (clearance de inulina), Fluxo Sanguíneo Renal, Pressão Arterial Média, Resistência Vascular Renal e Volume Urinário entre os grupos de ratos tratados.....	26
Tabela 2.	Comparação dos dados de Concentração de Sódio e Potássio no Plasma, Osmolaridade Plasmática e Clearance de Creatinina entre os grupos de ratos tratados.....	29
Tabela 3.	Comparação dos dados de Fração de Excreção de Sódio, Fração de Excreção de Potássio, Osmolaridade da Urina e transporte de Água Livre entre os grupos de ratos tratados.....	30
Tabela 4.	Comparação dos dados histológicos entre os grupos de ratos tratados.....	32

Lista de Abreviaturas e Símbolos

ADEA	-	Alteração Degenerativa Epitelial Aguda
AINHs	-	Antiinflamatórios Não-Hormonais
ANOVA	-	Analysis of Variance
AVP	-	Arginina vasopressina
C creat	-	Clearance de creatinina
C in	-	Clearance de inulina
Contr	-	Controle
COX	-	Ciclooxigenase
COX-1	-	Ciclooxigenase –1
COX-2	-	Ciclooxigenase –2
CsA	-	Ciclosporina A
CSFK	-	Concentração sanguínea de FK
CYP 3A4	-	Citocromo P 450 3A4
DS	-	Diclofenaco Sódico
DT	-	Dilatação Tubular
ELISA	-	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FE K	-	Fração de Excreção de Potássio
FE Na	-	Fração de Excreção de Sódio
FK 506	-	Tacrolimus

Lista de Abreviaturas e Símbolos

FK BP	- FK Binding proteins
FSR	- Fluxo Sanguíneo Renal
G-M CSF	- Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor
HE	- Hematoxilina Eosina
IL 2	- Interleucina 2
IL 3	- Interleucina 3
IL 4	- Interleucina 4
IRA	- Insuficiência Renal Aguda
IRC	- Insuficiência Renal Crônica
6-Keto- PGF _{1α}	- 6-Keto-Prostaglandina F _{1α}
NF-AT	- Nuclear Factor of Activated T cells
NTA	- Necrose Tubular Aguda
P K	- Concentração plasmática de potássio
P Na	- Concentração plasmática de sódio
p. o.	- per os
PAM	- Pressão Arterial Média
PAMS	- Periodic Acid Methenamine Silver
PAS	- Periodic Acid Schiff

Lista de Abreviaturas e Símbolos

PE 160	-	Cateter de Polietileno caliber 160
PE 190	-	Cateter de Polietileno caliber 190
PE 50	-	Cateter de Polietileno calibre 50
PG	-	Prostaglandina
PGE ₂	-	Prostaglandina E ₂
PGI ₂	-	Prostaciclina
RFG	-	Ritmo de Filtração Glomerular
RO	-	Rofecoxib
RVR	-	Resistência Vascular Renal
SEM	-	Standard Error of Mean
SRA	-	Sistema Renina-angiotensina
TNF α	-	Tumor Necrosis Factor alfa
TX	-	Tromboxano
TXA ₂	-	Tromboxano A ₂
TXB ₂	-	Tromboxano B ₂
VT	-	Vacuolização Tubular
VU	-	Volume Urinário

Introdução: O tacrolimus (FK 506) é uma potente droga imunossupressora, pode causar nefrotoxicidade aguda com diminuição do fluxo sanguíneo renal (FSR) e ritmo de filtração glomerular (RFG). Os antiinflamatórios não-hormonais (AINHs) convencionais podem causar nefrotoxicidade, interferindo na hemodinâmica renal e na homeostase de fluidos e eletrólitos. Recentemente surgiram novas drogas do grupo coxib que são inibidores seletivos da COX-2, e portanto teriam menos efeitos colaterais relacionados à inibição da COX-1(gástricos, cardíacos e renais). O crescente uso do FK 506 e o intenso uso de AINHs com finalidade analgésica e ou antiinflamatória aumenta a possibilidade de utilização em conjunto, potencializando o risco de nefrotoxicidade das duas drogas. **Objetivo:** Comparar a função renal de ratos sob os efeitos do uso simultâneo do FK e de um inibidor não-seletivo da COX, o diclofenaco sódico (DS) e do FK e de um inibidor seletivo da COX-2, o rofecoxib (RO). **Materiais e Método:** Utilizaram-se ratos Munich-Wistar machos em dieta hipossódica (0,06%) por 7 dias e tratamento por gavagem por 7 dias com FK (2 mg/kg/dia), DS (10mg/kg/dia), RO (3mg/kg/dia), FK+DS, FK+RO e veículo (Contr). Aferidos ritmo de filtração glomerular (RFG, depuração de inulina, ml/min/100g); o fluxo sanguíneo renal (FSR, ultrassom Doppler, ml/min); a pressão arterial média (PAM, probe intracarotídeo, mmHg); a resistência vascular renal (RVR, mmHg/ml/min); hematócrito (Ht); o volume urinário (VU, µl/min); a depuração de solutos; a histologia renal; o peso dos animais (g) e a concentração sanguínea de FK CSFK, ng/ml). Os resultados são apresentados com médias±erro padrão da

média e comparados por ANOVA seguido do teste Student-Neuman-Keuls.

Resultados: O RFG do grupo DS foi $0,98 \pm 0,03$, do RO foi $1,06 \pm 0,04$ e do FK $0,99 \pm 0,06$ similares ao controle ($1,10 \pm 0,05$). Houve queda do RFG nos grupos FK+RO ($0,86 \pm 0,06$; $p < 0,05$ vs RO e Contr) e FK+DS ($0,63 \pm 0,06$; $p < 0,001$ vs Contr, DS, RO e FK; $p < 0,01$ vs FK+RO). O FSR, a PAM, a RVR e o Ht foram semelhantes em todos os grupos. A diurese foi menor nos grupos com associação de drogas, mas houve diferença estatisticamente significativa apenas entre os grupos FK+DS e RO ($8,38 \pm 0,46$ vs $12,99 \pm 1,22$; $p < 0,05$). Não ocorreram modificações histológicas significativas nos grupos estudados. O grupo FK+DS apresentou variação de peso (-18 ± 5) estatisticamente significativa em relação aos grupos Contr 6 ± 2 e RO 5 ± 2 ($p < 0,001$) e DS $0,2 \pm 4$ e FK+RO -1 ± 2 ($p < 0,01$). A CSFK diminuiu significativamente ($p < 0,05$) para os grupos FK+DS e FK+RO ($1,7 \pm 0,3$ e $1,8 \pm 0,4$) em relação ao grupo FK ($3,2 \pm 0,4$).

Conclusões: A associação do FK com um inibidor não-seletivo da COX causou diminuição mais acentuada do RFG independentemente da diminuição do FSR ou aumento da RVR, sendo provavelmente decorrente da diminuição do Kf. A tendência à antidiurese foi similar para a associação do FK com as duas classes de AINHs. O FK associado com um inibidor não-seletivo da COX causou discreta toxicidade sistêmica quando comparado com inibidor seletivo da COX-2. Nos animais tratados com AINHs, as concentrações sanguíneas do FK foram significativamente menores.

Palavras-Chave: 1. Nefrotoxicidade aguda; 2. Tacrolimus; 3. Rofecoxib; 4. Diclofenaco sódico; 5. Antiinflamatórios não-hormonais.

Introduction: Tacrolimus (FK 506) is a potent immunosuppressive drug that may cause nephrotoxicity decreasing the renal blood flow (RBF) and glomerular filtration rate (GFR). Conventional non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) may cause nephrotoxicity, interfering with renal hemodynamics and fluid and electrolyte homeostasis. Recently, new selective COX-2 inhibitors have been developed producing less side effects (gastric, cardiac and renal) related to COX-1 inhibition. The increasing use of FK 506 and the intensive use of NSAIDs with analgesic or anti-inflammatory purposes, increases the possibility of a drug combination, potentiating the nephrotoxic risk of the two drugs.

Objective : Compare the renal function of rats receiving combination therapy with FK and a non-selective COX inhibitor, sodium diclofenac (SD) with those receiving FK and a selective COX-2 inhibitor, rofecoxib (RO). **Material and**

Methods : Male Munich-Wistar rats receiving a low sodium diet (0.06%) for 7 days and gavage treatment for 7 days with FK (2 mg/kg/day), SD (10 mg/kg/day), RO (3 mg/kg/day), FK+SD, FK+RO and vehicle (control) were used. Glomerular filtration rate (GFR, inulin clearance, ml/min/100g); renal blood flow (RBF, Doppler ultrasound, ml/min); mean blood pressure (MBP, intracarotid probe, mmHg); renal vascular resistance (RVR, mmHg/ml/min); hematocrit (Htc); urinary volume (UV, μ l/min); solute clearance; renal histology; animal weight (g) and FK serum concentration (SCFK, ng/ml) were assessed. Results are presented as a mean \pm standart deviation and compared by ANOVA followed by Student-Neuman-Keuls test. **Results :** The GRF of the SD group was 0.98 ± 0.03 , RO 1.06 ± 0.04 and FK 0.99 ± 0.06 similar to control values

Abstract

(1.10 ± 0.05). GRF values decreased in the FK+RO (0.86 ± 0.06 ; $p < 0.05$ vs RO and Control) and FK+SD (0.63 ± 0.06 ; $p < 0.001$ vs control, FK and SD groups and $p < 0.01$ vs FK+RO) groups. RBF, MBP, RVR and Htc values were similar in all groups. Diuresis was lower in the groups with drug combination, but there was a statistically significant difference only between FK+SD and RO groups (8.38 ± 0.46 vs 12.99 ± 1.22 ; $p < 0.05$). There were no significant histological changes in the treatment groups. The FK+SD group showed statistically significant weight changes (-18 ± 5) when compared to the Control and RO groups (6 ± 2 and 5 ± 2 , respectively; $p < 0.001$) and to the SD and FK+RO groups (0.2 ± 4 and 1 ± 2 , respectively; $p < 0.01$). SCFK was significantly decreased ($p < 0.05$) for FK+SD and FK+RO (1.7 ± 0.3 and 1.8 ± 0.4) groups when compared to the FK group (3.2 ± 0.4). **Conclusions:** The combination of FK and a non-selective COX inhibitor significantly decreased GFR regardless of a RBF decrease or RVR increase, and is probably a result of Kf decrease. The trend to antidiuresis was similar for the combination of FK with both classes of NSAIDs. FK combined to a non-selective COX inhibitor caused a mild systemic toxicity when compared with the COX-2 selective inhibitor. Serum FK concentrations were significantly lower in NSAIDs treated animals.

Key-words: 1. Acute nephrotoxicity; 2. Tacrolimus; 3. Rofecoxib; 4. Sodium diclofenac; 5. Non-steroidal anti-inflammatory drugs

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O fármaco FK 506 foi isolado em 1984, pela fermentação do fungo *Streptomyces tsukubaensis* encontrado no solo de Tsukuba, no Japão.⁽¹⁾ Classificado quimicamente como macrolídeo lactona hidrofóbico, com peso molecular de 822 daltons, exerce in vitro atividade imunossupressora 10 a 100 vezes maior que a ciclosporina A (CsA).⁽²⁾ O nome genérico Tacrolimus é um neologismo composto de **Tsukuba macrolide immunosuppressive**.⁽³⁾ Pode ser administrado pelas vias endovenosa, oral e tópica. A absorção após administração oral é variável e incompleta, com biodisponibilidade no adulto de 4% a 93%, em média 25%. A absorção é prejudicada quando ingerido com alimentos, principalmente gordurosos. A ligação às proteínas plasmáticas, albumina e α -1 glicoproteína ácida é de 99% e a concentração sanguínea com doses terapêuticas varia entre 5 a 20 ng/ml. O aumento da meia-vida e a diminuição do clearance podem ocorrer quando há insuficiência hepática.⁽⁴⁾ Com aplicação tópica, a pomada de FK 506 a 0,3% tem absorção menor que 4% em pacientes com dermatite atópica.⁽⁵⁾ Em humanos é metabolizado intensamente pelo fígado, eliminado principalmente pela bile e menos de 1% é excretado na urina como droga inalterada.⁽⁶⁾ O citocromo P 450 3A4 (CYP3A4) é o principal responsável pelo seu metabolismo e, de 8 metabólitos, o 13-O-demetilato é o dominante in vivo e in vitro, apresentando apenas 6,4% de atividade farmacológica quando comparado com o FK 506.⁽⁷⁾

Sua atividade imunossupressora decorre da inibição da ativação de células T nas etapas iniciais. Após penetrar pela membrana celular, liga-se ao receptor

intracelular, uma proteína, a imunofilina ou FK-binding proteins (FK-BP). Esse complexo bloqueia a ação do Ca^{++} e calmodulina na ativação da calcineurina fosfatase, responsável pela desfosforilação da subunidade citoplasmática do fator nuclear das células T ativadas (nuclear factor of activated T cells – NF-AT). Somente na forma desfosforilada a subunidade citoplasmática do NF-AT pode translocar através do citosol para dentro do núcleo. A não-penetração no núcleo impede a transcrição dos genes das citocinas, dependentes do NF-AT nuclear, como a interleucina 2 (IL2), interleucina 3 (IL3), interleucina 4 (IL4), fator estimulador de colônias - granulócitos-macrófagos (granulocyte-macrophage colony stimulating factor - G-M CSF), fator de necrose tumoral α (tumor necrosis factor α – TNF α), contribuindo desse modo para a imunossupressão celular e humoral.⁽⁸⁻¹¹⁾

A atividade imunossupressora do FK 506 foi demonstrada *in vitro* por Kino *et al.*⁽¹⁾ e em ratos por Ochiai *et al.*⁽¹²⁾ em 1987, tendo sido originalmente utilizado como terapia substitutiva em pacientes com transplante de fígado que apresentaram rejeição após terapia imunossupressiva com a CsA.⁽¹³⁾ A partir de 1989 sua eficácia terapêutica tem sido comprovada, por estudos clínicos, na prevenção da rejeição de transplantes de fígado, coração e rins, em adultos e crianças.⁽¹³⁻¹⁶⁾ Estudos comparando a eficácia terapêutica em pacientes tratados com FK 506 e CsA após transplante de fígado e rins mostraram que o FK 506 reduziu significativamente a incidência de episódios agudos de rejeição em relação à CsA, porém a taxa de sobrevivência após 1 ano de pacientes e enxertos foi similar para as duas drogas.^(17,19) Estudo experimental de transplante renal em ratos mostrou resultados semelhantes, com melhor

desempenho do FK 506 em relação à rejeição aguda e resultados comparáveis à CsA como terapia primária, quanto à taxa de sobrevivência dos animais e dos enxertos e efeitos colaterais renais.⁽²⁰⁾

Nos últimos 10 anos, o FK 506 tem sido utilizado no tratamento de doenças autoimunes dependentes de células T, tais como uveíte, síndrome nefrótica e artrite reumatóide.⁽²¹⁻²³⁾ Em patologias dermatológicas autoimunes, vários estudos clínicos comprovaram sua eficácia, com a administração sistêmica em doses de 0,1 a 0,2 mg/kg/dia, em doenças como psoríase, Behçet e pioderma gangrenoso.⁽²⁴⁻²⁸⁾

A utilização do FK 506 por tempo prolongado na prevenção da rejeição de transplantes de órgãos e no tratamento de doenças autoimunes tem como fator limitante sua nefrotoxicidade. Estudos clínicos e experimentais demonstraram disfunção renal e anormalidades estruturais nos rins, sugerindo que o FK 506 não é menos tóxico que a CsA.⁽²⁹⁻³²⁾ A nefrotoxicidade crônica (após 1 mês de tratamento) é similar à encontrada com o uso da CsA, verificando-se alterações histológicas permanentes como hialinose arteriolar, atrofia tubular, acúmulo intersticial de macrófagos e fibrose intersticial em faixas.⁽³³⁻³⁵⁾ Estudos comparando a nefrotoxicidade aguda do FK 506 e CsA em ratos demonstraram que o FK 506 tem menor efeito vasoativo na hemodinâmica renal, porém provoca alterações glomerulares e tubulares semelhantes às verificadas com a CsA.^(36,37)

O efeito nefrotóxico agudo, devido às alterações hemodinâmicas, é reversível e não acarreta modificações estruturais. Esses efeitos hemodinâmicos que provocam a diminuição do fluxo sanguíneo renal (FSR) e

do ritmo de filtração glomerular (RFG) com conseqüente aumento da creatinina sérica estão relacionados à vasoconstrição das arteríolas aferentes e eferentes, sendo atribuídos à secreção de eicosanóides vasoconstritores, secreção de endotelina, estímulo simpático e inibição da calcineurina fosfatase renal.⁽³⁸⁻⁴¹⁾ Estudos sobre as alterações funcionais e morfológicas renais causadas pelo FK 506 são escassos. Em biopsias de pacientes transplantados, as modificações histológicas foram semelhantes às encontradas com o uso da CsA. Trabalho publicado pelo Japanese FK 506 Study Group⁽⁴²⁾ evidenciou que o marcador precoce da nefrotoxicidade do FK 506 foi a vacuolização tubular e que a administração prolongada provocou fibrose intersticial e hialinose arteriolar, semelhantes às previamente descritas com a CsA.⁽⁴³⁾

Burdmann *et al.*⁽³⁴⁾ desenvolveram um modelo de nefrotoxicidade aguda e crônica, em ratos com dieta hipossódica, reproduzindo as alterações histológicas e funcionais similares às observadas em humanos. Com dieta pobre em sal, a administração de FK 506 na dose de 6 mg/kg p.o. durante 7 dias causou diminuição de 30% no FSR e de 80% RFG, caracterizando a nefrotoxicidade aguda. A administração por 21 dias, provocou fibrose intersticial e hialinose arteriolar, caracterizando a nefrotoxicidade crônica. A concentração sanguínea de FK 506 foi semelhante à encontrada em pacientes transplantados que recebem 0,3 mg/kg/dia p.o., porém, para os ratos a dose diária utilizada foi 20 vezes maior (6mg/kg/dia p.o.). Nesse estudo a nefrotoxicidade provocada pelo FK 506 foi mais evidente com a dieta hipossódica; com dieta normal em sal, a função renal não foi diferente da encontrada nos controles.⁽³⁴⁾ Estudos em animais têm demonstrado que a

dieta hipossódica provoca a ativação do sistema renina-angiotensina (SRA), causando vasoconstrição e isquemia renal.⁽⁴⁴⁾ Em humanos, a restrição de sódio tem conseqüências adversas, particularmente em idosos, devido às alterações hemodinâmicas e ativação do SRA, podendo acarretar insuficiência renal aguda nos pacientes que fazem uso de várias drogas.⁽⁴⁵⁾

Estudo clínico realizado em 1991 evidenciou aumento de creatinina, acima de 2 mg/dl durante o primeiro mês de tratamento com FK 506 (nefrotoxicidade aguda), cerca de 50% dos pacientes, porém, tinham outros fatores associados ou potencializadores, tais como a co-administração de antibióticos nefrotóxicos.⁽²⁹⁾ A associação de imunossupressores com outras drogas pode causar efeitos adversos e modificações na sua concentração sanguínea. Dados preliminares sugerem que a associação do FK 506 com antiinflamatórios não-hormonais (AINHs), apresentam interação farmacodinâmica, aumentando o risco de nefrotoxicidade.⁽⁴⁶⁾ O mecanismo pelo qual o FK 506 causa nefrotoxicidade tem sido atribuído às alterações no metabolismo das prostaglandinas (PG) renais, com predomínio da ação de prostanóides vasoconstritores, que aumentam a resistência vascular renal, com conseqüente queda do FSR e RFG.^(31,38) O sistema de homeostase renal produz PGs vasodilatadoras, visando a atenuar o efeito vasoconstritor causado pelo FK 506. Com o uso concomitante de AINHs, esse mecanismo compensador não é eficaz, pois os AINHs inibem a produção de PGs, bloqueando a enzima ciclooxigenase. Em 1994 foram relatados dois casos de insuficiência renal aguda associadas ao uso concomitante do FK 506 e

ibuprofeno em transplantados de fígado, chamando a atenção para o efeito adverso renal devido à associação do imunossupressor e AINHS.⁽⁴⁷⁾

Os AINHS são drogas amplamente utilizadas na prática clínica para tratamento da dor e inflamação. Abrangem diversos grupos químicos e a maioria inibe a atividade da enzima ciclooxigenase (COX). A COX constitui a enzima chave para a conversão do ácido aracdônico em prostaglandina H₂, o precursor comum na síntese das prostaglandinas (PG), prostaciclina e tromboxanos (TX). Existem duas isoformas da COX, com as mesmas propriedades catalíticas, mas que diferem em termos de regulação e padrão de expressão. A COX-1 é a isoforma constitutiva, de maior expressão em vários tecidos, participando da síntese de prostanóides com diferentes funções, tais como citoproteção gástrica, manutenção da homeostase renal e agregação plaquetária. A COX-2 está presente em níveis basais em todos os tecidos e sua expressão é regulada por estímulos inflamatórios ou mitógenos.^(48,49) Estímulos inflamatórios provocam a migração de leucócitos e ativação das células endoteliais. As citocinas, as moléculas de adesão e a indução da ciclooxigenase e lipooxigenase dos tecidos promovem a secreção de prostaglandinas e leucotrienos ocasionando eritema, edema e dor, sinais clínicos da inflamação. Nesse processo é importante a participação da enzima COX-2, com a secreção de prostaglandina E₂ (PGE₂), prostaciclina (PGI₂) e tromboxano (TXA₂), responsáveis pelo aumento do fluxo sanguíneo no local da inflamação e pela agregação plaquetária.⁽⁵⁰⁾ Nos rins, as duas isoformas da COX estão expressas constitutivamente em diferentes níveis, nas várias regiões e segmentos do nefron. Yang *et al.*, verificaram que a COX-1 e a COX-

2 estavam expressas em altos níveis nas células intersticiais da medula interna, com níveis mais baixos na medula externa e córtex. A COX-1 era predominante nos glomérulos e ao longo dos ductos coletores, enquanto a COX-2 estava restrita à mácula densa, ramo ascendente espesso cortical e em níveis significativamente baixos nos ductos coletores da medula interna. A manutenção dos ratos com baixo ou alto aporte de sal por 1 semana não afetou a expressão da COX-1. No entanto, conforme as condições de dieta hiper ou hipossódica, a expressão da COX-2 no córtex e medula foi diferente, sugerindo que as PGs têm funções específicas conforme as regiões dos rins em que são secretadas. Na região medular, têm importante papel na excreção de sal e água em condições de hipervolemia, enquanto na região cortical, protegem a circulação glomerular em condições de depleção de volume.⁽⁵¹⁾ Os prostanóides derivados da COX-1 e COX-2 exercem importante papel na função renal, conforme as regiões em que são expressos. Participam na regulação dos efeitos vasomotores através das arteríolas aferentes, eferentes e capilares glomerulares e na função de transporte no segmento terminal do nefron e túbulos coletores.⁽⁵²⁾

Os AINHs são drogas efetivas no tratamento de várias condições clínicas, possuindo atividades antipirética, analgésica e antiinflamatória. Nos últimos anos do século XIX a aspirina demonstrou valor como agente analgésico, antiinflamatório e antitrombótico, porém o mecanismo de ação permaneceu obscuro até 1971, quando então foi proposta sua ação como inibidora da síntese de PG.⁽⁵³⁾ Nos anos 60, outros AINHs foram desenvolvidos, porém os efeitos tóxicos permaneceram semelhantes aos da aspirina. Esses AINHs

convencionais, como diclofenaco, ibuprofeno e naproxeno, são inibidores não-seletivos da COX, bloqueiam a produção tanto das prostaglandinas com ações fisiológicas como daquelas com ação inflamatória. A inibição da COX-1 está associada aos efeitos adversos dos AINHS no trato gastrointestinal, coração e rins. No trato gastrointestinal causa principalmente ulcerações e sangramento.^(54,55) As reações adversas nos rins e coração ocorrem mais freqüentemente em pacientes com problemas renais ou cardíacos prévios, condições em que as prostaglandinas são essenciais para a manutenção do balanço vasoconstricção/dilatação na regulação da homeostase. Sob condições euvolêmicas, a síntese das prostaglandinas renais não tem significância na função renal.⁽⁵⁶⁾ Por outro lado, estímulos vasoconstritores, tais como estímulo simpático adrenérgico e/ou angiotensina II, desencadeiam mecanismos reguladores compensatórios que elevam a síntese das PGs renais com ação vasodilatadora. Essa condição tem sido definida como “estado renal PG dependente”, no qual a síntese de PGs se contrapõe aos estímulos vasoconstritores, procurando manter o ritmo de filtração glomerular, o fluxo sanguíneo renal e excreção de sódio.⁽⁵⁷⁾ A nefrotoxicidade dos AINHS tem sido estudada experimentalmente em modelos animais, o que possibilitou determinar os mecanismos fisiopatológicos e a definição do “estado renal PG dependente”.⁽⁵⁸⁻⁶¹⁾ Várias condições, como depleção de sódio, hipovolemia, insuficiência cardíaca congestiva, cirrose hepática, isquemia renal, obstrução uretral, hipertensão, diabetes, idade, toxicidade dos aminoglicosídeos e nefrotoxicidade da CsA e FK 506 caracterizam condições em que as PGs renais são importantes na manutenção da homeostase. Nessas situações, o

uso de AINHs potencializa os efeitos nefrotóxicos, bloqueando a liberação das PGs e causando diminuição do RFG, FSR e retenção de água e sódio.^(62,63) Kleinknecht *et al.*, em pesquisa para determinar a frequência e as causas da insuficiência renal aguda (IRA), detectaram que 18,3% foram induzidos por drogas. Os AINHs provocaram nefrotoxicidade em 15,6%, ocupando o 3º lugar em incidência, precedido pelos antibióticos (34,2%) e analgésicos (19,8%).⁽⁶⁴⁾

Recentemente, foram desenvolvidas drogas da classe coxib, que são 100 a 1000 vezes mais seletivos como inibidores da enzima COX-2 do que a COX-1, visando à diminuição dos efeitos colaterais no trato gastrointestinal, sistema cardiovascular e renal. Pesquisas têm demonstrado que os inibidores seletivos da COX-2 não induzem dano na mucosa gástrica em animais e causam menos lesões gastrointestinais em humanos quando comparados com os AINHs convencionais.⁽⁶⁵⁻⁶⁹⁾

Em ratos, por imunohistoquímica, foi evidenciada a expressão constitutiva da enzima COX-2 na mácula densa e células da alça espessa ascendente, sugerindo o papel dessa enzima na regulação da secreção da renina e no processo de homeostase renal prostaglandina-dependente.^(51,70) Estudos experimentais com inibidores seletivos da COX-2 em ratos normais e hipertensos evidenciaram aumento da pressão arterial, retenção de sódio e água; no entanto, não ocorreram alterações na filtração glomerular ou no fluxo sanguíneo renal.^(65,71,72) Diferentemente dos experimentos em ratos, em cães, Black *et al.* observaram que o inibidor da COX-2, o MF-tricíclico, não provocou alterações hemodinâmicas ou excretoras em condições normo ou hipovolêmicas. Entretanto, o inibidor não-seletivo da COX, a indometacina,

induziu significativa vasoconstricção renal nos animais hipovolêmicos, sugerindo uma maior participação da COX-1 que da COX-2 nos efeitos renais dos AINHs em cães.⁽⁷³⁾ Humanos idosos, sem insuficiência renal, tratados com celecoxib ou naproxeno, apresentaram diminuição do RFG significativamente maior nos pacientes tratados com naproxeno.⁽⁷⁴⁾ No entanto, nos estudos clínicos em pacientes idosos com dieta hipossódica, condição clínica em que a adequada perfusão renal é considerada “PG dependente”, os efeitos adversos renais dos AINHs inibidores seletivos da COX-2 e os não-seletivos foram semelhantes.^(75,76) Perazella *et al.* publicaram dois casos de insuficiência renal aguda, após uso de celecoxib em pacientes com insuficiência renal crônica (IRC), mas comentam que o potencial nefrotóxico desses novos agentes é atualmente desconhecido.⁽⁷⁷⁾ Brater, em artigo de revisão, abordou a dificuldade em se estabelecer com segurança o perfil de nefrotoxicidade comparando-se os AINHs tradicionais e os inibidores seletivos da COX-2. Os resultados não são conclusivos, pois os estudos clínicos utilizam modelos e protocolos diferentes, não permitindo uma comparação rigorosa.^(63,78) Atualmente tem sido descrito na literatura a ocorrência de insuficiência renal aguda após o uso de inibidores seletivos da COX-2.⁽⁷⁹⁻⁸³⁾

O crescente uso do FK 506, tanto na prevenção da rejeição de transplantes como no tratamento de doenças autoimunes e o uso concomitante de AINHs, com finalidade analgésica e/ou antiinflamatória, ocorre freqüentemente. O uso do FK 506 leva ao “estado renal PG dependente”, condição em que a administração simultânea de AINH pode provocar alterações significativas na função renal.⁽⁵⁷⁾

A necessidade de estudos experimentais, comparando os efeitos tóxicos renais dos inibidores seletivos da COX-2 com os não-seletivos, para definição dos mecanismos de ação e a verificação da nefrotoxicidade em diferentes situações, tais como o uso isolado ou concomitante com outras drogas motivou a realização deste trabalho.

1.1. Objetivo

O objetivo deste estudo é comparar a função renal em ratos sob os efeitos do uso simultâneo do FK 506 e de um inibidor não-seletivo da COX, o diclofenaco sódico (DS) e do FK 506 e de um inibidor seletivo da COX-2, o rofecoxib (RO).

2. MATERIAIS E MÉTODO

2. MATERIAIS E MÉTODO

2.1. Animais e dieta

Foram incluídos no estudo 125 ratos machos adultos Munich-Wistar, provenientes do Biotério da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, com peso inicial aproximado de 250 gramas. Os animais foram designados a dois grandes grupos para o desenvolvimento do experimento: um, para avaliar o ritmo de filtração glomerular (RFG) e as alterações histológicas do tecido renal; outro, para avaliação das alterações da hemodinâmica renal, da depuração renal de solutos e do nível sanguíneo de FK 506. Permaneceram em gaiolas com temperatura e luz ambiental controladas. Receberam dieta pobre em sal 0,06% e normoprotéica 25% (ração Harlam Teklad Premier, Madison, Wiscosin, EUA), com livre acesso a água, uma semana antes da administração das drogas e durante todo o período da pesquisa. Todos os animais tiveram livre acesso à água potável e receberam dieta em igual quantidade. O peso dos animais foi verificado diariamente.

Esse trabalho foi submetido à avaliação da Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, e aprovado sem restrições.

2.2. Drogas

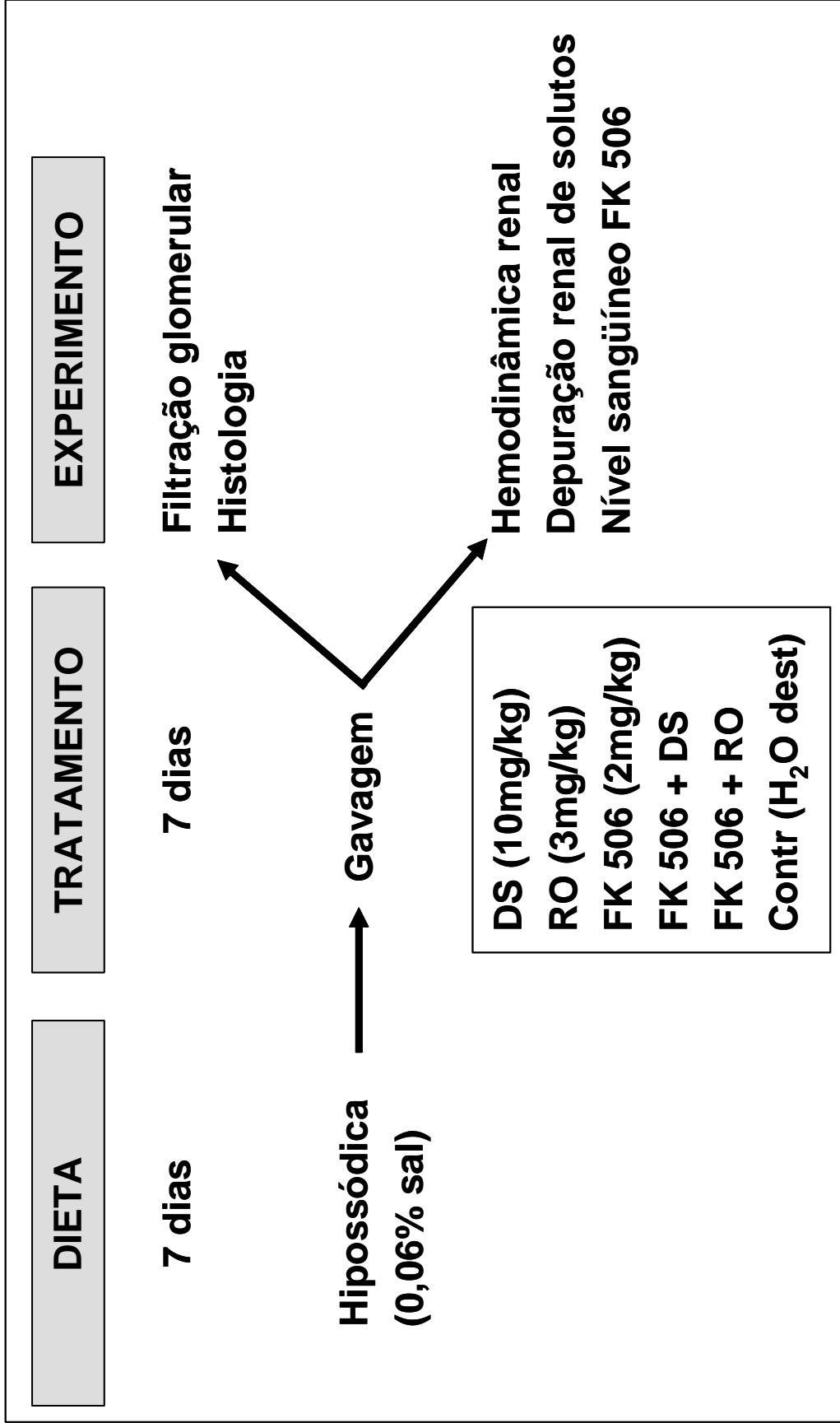
O FK 506, proveniente do Laboratório Fugisawa, Osaka, Japão, encontra-se na forma de dispersão sólida e foi dissolvido em água destilada com concentração final de 0,6 mg/ml. O Diclofenaco sódico (DS), Voltaren Retard^R, proveniente do laboratório Novartis, Biociência S.A, Taboão da Serra, São Paulo, Brasil, encontra-se em comprimidos de 100 mg, foram dissolvidos em 10 ml de água destilada, com concentração final de 10 mg/ml. O Rofecoxib (RO), Vioxx^R, proveniente do Laboratório Merck Sharp & Dohme, de México S.A. de CV, Xotepingo, México, DF, encontra-se sob a forma de comprimidos de 25 mg que foram dissolvidos em 10 ml de água destilada, com concentração final de 3 mg/1,2 ml.

2.3. Protocolo Experimental

Os animais receberam durante uma semana dieta hipossódica e a seguir foram divididos aleatoriamente em 6 grupos. As drogas foram dissolvidas em água destilada e administradas por gavagem durante 7 dias. O primeiro grupo (DS) recebeu diariamente 10 mg/kg de solução de diclofenaco sódico, semelhante à dosagem utilizada em modelo experimental para dor articular inflamatória aguda em ratos.⁽⁸⁴⁾ O segundo grupo (RO) recebeu diariamente 3 mg/kg de solução de rofecoxib. Essa dosagem e via de administração foram escolhidas, com base em estudo que mostrou redução do edema e dor articular em modelo experimental de artrite induzida por *Mycobacterium butyricum* em ratos.⁽⁶⁷⁾ O terceiro grupo (FK) recebeu diariamente 2mg/kg de FK 506,

dosagem esta escolhida por não causar nefrotoxicidade aguda em ratos.⁽³⁴⁾ O quarto grupo (FK+DS) e o quinto grupo (FK+RO) receberam duas drogas associadas nas mesmas dosagens e com os mesmos critérios utilizados para os fármacos isolados. O sexto grupo, controle (Contr), foi tratado apenas com água destilada, veículo utilizado para a diluição das três drogas.

Os animais foram estudados após 7 dias de tratamento, com os procedimentos sendo realizados sob anestesia geral com pentobarbital sódico por via intra-peritoneal na dose de 50 mg/kg de peso corporal. Foi realizada traqueostomia para a inserção de um cateter de polietileno (PE 160), a fim de assegurar ventilação adequada e aspiração de secreções. A artéria carótida esquerda e a veia jugular direita foram canuladas com cateteres de polietileno (PE 50), a primeira com a finalidade de medir a pressão arterial média (PAM) e obter amostras de sangue, e a segunda para infusão de soluções. Todas as incisões foram suturadas ao término da intervenção. Um eletrodo sensor de pressão foi conectado ao cateter arterial para registro contínuo em aparelho monitor de pressão arterial (Stoelting, Wood Dale, I11, EUA).



2.4. Estudos de filtração glomerular e histologia

2.4.1. Filtração glomerular (depuração renal de inulina)

Esse procedimento foi realizado 24 h após a última dose dos medicamentos ou do veículo. Os ratos foram anestesiados e submetidos a cirurgia básica para acesso à artéria carótida e veia jugular. Para coleta de urina, após incisão abdominal mediana inferior, foi realizada cistostomia para inserção e fixação de cateter de polietileno (PE 190) na bexiga. A uretra foi ligada para evitar perda de urina. Após a sutura das incisões cirúrgicas, os animais receberam 6 ml de solução salina isotônica a 0,9% pela veia jugular, para reposição das perdas fluídas. Uma dose inicial de 1 ml de solução de inulina (Sigma, EUA), obtida pela diluição de 25 mg de inulina por ml de solução de cloreto de sódio a 0,9%, foi administrada por via endovenosa, seguida de infusão contínua, por bomba, dessa mesma solução a uma velocidade de 0,06 ml/minuto (Harvard Apparatus, Holliston, MA, EUA). Após um intervalo de equilíbrio de 40 minutos, foram coletadas amostras de urina em 3 períodos sucessivos de 20 minutos, em frascos previamente pesados. Uma amostra de sangue de 0,3 ml foi obtida no tempo médio de cada período, repondo-se igual volume de solução salina. As concentrações sanguínea e urinária de inulina foram determinadas pelo método químico da antrona em espectro-fotômetro (ByoSystems BTS 310, Barcelona, Espanha). Os dados de depuração renal de inulina (Cin), foram calculados em ml/min por 100 g de peso calculando-se a média dos períodos de coleta. Os resultados para a PAM

representaram a média de pelo menos dois registros por período. O volume urinário foi determinado pela diferença de peso dos tubos de coleta da urina (peso final do período de coleta - peso inicial do tubo).

2.4.2. Estudo histológico

Ao término dos experimentos, o rim esquerdo foi dissecado, removido e pesado. Seccionado longitudinalmente, foi fixado em formaldeído a 4% e incluído em parafina. Foram obtidas secções finas (2-3 μm), a seguir montadas, numeradas e coradas por Hematoxilina-Eosina (HE), Ácido Periódico de Schiff (Periodic Acid Schiff – PAS), prata metenamina (Periodic Acid Methenamine Silver – PAMS) e tricrômio de Masson. A análise da graduação morfológica para vacuolização tubular, dilatação tubular, alterações degenerativas epiteliais agudas, necrose tubular aguda, fibrose intersticial, hialinose arteriolar e esclerose glomerular foi realizada por um único profissional, que desconhecia a que grupos pertenciam as amostras. A fibrose intersticial foi definida pela coloração intersticial sólida comparada a áreas normais ou simplesmente edemaciadas do interstício. A atrofia tubular foi definida pela presença de túbulos menores que o normal, por espessamento de membrana basal tubular e pela observação de afinamento do epitélio. A esclerose glomerular global foi definida pela presença de esclerose completa e a segmentar caracterizada como hialinose. A graduação empregada foi de 0 a 3 pontos, referindo-se à alteração 0 (inexistente), 1 (leve), 2 (moderada) ou 3 (severa), respectivamente.

2.5. Estudos hemodinâmicos

No final do período de tratamento, os animais receberam a última dose das drogas estudadas e a seguir foram colocados em gaiolas metabólicas (Nalgene Co., Rochester, NY, EUA) por 24 horas, para coleta e medida do volume urinário total. Encerrada a coleta, as amostras de urina foram analisadas para sódio, potássio, creatinina e osmolaridade. Após 24 horas foram efetuadas as medidas de fluxo sanguíneo renal.

Após a preparação cirúrgica inicial, para acesso à artéria carótida e veia jugular conforme descrito anteriormente, realizou-se uma incisão abdominal mediana, para exposição da artéria renal esquerda, que foi cuidadosamente dissecada. Um sensor de tamanho adequado (série R, 1,5 mm, Transonic Systems, Ithaca, NY, EUA) foi colocado ao redor da artéria renal para medida direta do fluxo arterial renal em ratos. As incisões foram suturadas. Foram infundidos 6 ml de solução salina 0,9% para reposição das perdas fluídas cirúrgicas, seguidos de infusão salina a 0,9% para manutenção, com taxa de infusão de 0,06 ml/min, conforme já descrito nas experiências de depuração de inulina. Após um período de equilíbrio de 40 minutos, foram efetuadas 6 a 8 medidas de fluxo sanguíneo renal (FSR) através de um analisador ultra-sônico (T106, Transonic Systems, Ithaca, NY, EUA) num intervalo de 30 minutos, sendo cada medida representativa da média de pelo menos três registros. A PAM foi controlada continuamente, como já descrito. Calculou-se a resistência vascular renal (RVR) pela fórmula: $RVR = PA / \text{Fluxo mmHg/ml/min}$.

Ao término dos experimentos, colheu-se uma amostra de sangue (6ml) para determinação do hematócrito, das concentrações sanguíneas de FK 506, das concentrações de sódio, potássio e a osmolaridade plasmática.

2.6. Análises bioquímicas

As concentrações de sódio e potássio foram determinadas por analisador eletrolítico (9180 Electrolyte Analyser, AVL Scientific Co., Rowell, GA, EUA), a creatinina pelo método do picrato alcalino (Jaffe), analisada por espectrofotômetro (ByoSystems BTS 310, Barcelona, Espanha). A osmolaridade foi avaliada pela análise da depressão do ponto de congelamento em osmômetro (Osmette A, Precision Systems, Natick, MA, EUA). Os valores plasmáticos e urinários de creatinina, sódio, potássio e osmolaridade foram usados para calcular a depuração de creatinina (Creat); as excreções fracionais de sódio (FE Na) e potássio (FE K) e o transporte de água livre (Tc H₂O) pelas fórmulas:

$$C_{\text{creat}} = \frac{V' \times U_{\text{cr}}}{P_{\text{cr}}} \quad \text{ml/min/100g}$$

$$\text{Fe Na} = \frac{U_{\text{Na}} / P_{\text{Na}}}{U_{\text{cr}} / P_{\text{cr}}} \times 100$$

$$\text{Fe K} = \frac{U_{\text{K}} / P_{\text{K}}}{U_{\text{cr}} / P_{\text{cr}}} \times 100$$

$$Tc \text{ H}_2\text{O} = V' - Cl_{\text{osm}} \quad \text{ml/ min}$$

Os níveis sanguíneos de FK 506 foram determinados pelo método imunoenzimático, enzyme linked immunosorbent assay (Elisa), com anticorpo monoclonal anti-FK 506 (DiaSorin PRO-Trac™ II Tacrolimus - Stillwater, Minnesota, USA). Os padrões, controles e amostras foram extraídos com os reagentes apropriados, adicionado cromógeno e a leitura da absorbância em comprimento de onda duplo de 450/630 nm. O desenvolvimento da cor é inversamente proporcional à quantidade de tacrolimus presente na amostra. As concentrações são obtidas a partir de uma curva padrão.

2.7. Análise estatística

Utilizou-se a análise de variância (ANOVA) com posteriores comparações múltiplas pelo teste de ordenação de médias de Student-Neuman-Keuls.

Os resultados são apresentados como médias \pm erro padrão da média (SEM). Os valores de p menores que 0,05 foram considerados significantes.

3. RESULTADOS

3. RESULTADOS

Os resultados são apresentados com médias±erro padrão da média, comparações múltiplas entre os grupos tratados com apenas um medicamento, com associação de medicamentos e com o grupo controle.

3.1. Filtração glomerular e Volume urinário

Os dados da filtração glomerular determinados pelo clearance de inulina (Cin) e do volume urinário (VU) são apresentados na Tabela 1 e Figuras 1 e 2. Após uma semana de tratamento, a filtração glomerular nos grupos tratados com apenas um medicamento foi: DS $0,98\pm 0,03$ ml/min/100g, RO $1,06\pm 0,04$ ml/min/100g, e FK $0,99\pm 0,06$ ml/min/100g, não havendo diferença estatisticamente significativa com o Contr ($1,10\pm 0,05$ ml/min/100g). Nos grupos com associação de medicamentos, o grupo FK+RO apresentou queda significativa do Cin ($0,86\pm 0,06$ ml/min/100g) quando comparado ao RO e ao Contr ($p<0,05$), mas não quando comparado ao FK isolado. Com a associação FK+DS, verificou-se diminuição do Cin $0,63\pm 0,06$ ml/min/100g estatisticamente significativa em relação aos grupos Contr, DS, RO e FK ($p<0,001$) e em relação ao FK+RO ($p<0,01$).

O volume urinário (VU) foi menor nos grupos com associação de drogas (FK+DS e FK+RO), mas apenas o do grupo FK+DS $8,38\pm 0,46$ µl/min apresentou diminuição estatisticamente significativa quando comparado com o grupo RO $12,99\pm 1,22$ µl/min ($p<0,05$), mas não quando comparado com os

grupos Contr $12,11 \pm 1,52$ $\mu\text{l}/\text{min}$, DS $10,71 \pm 0,87$ $\mu\text{l}/\text{min}$, FK $11,71 \pm 0,84$ $\mu\text{l}/\text{min}$ e FK+RO $10,16 \pm 1,32$ $\mu\text{l}/\text{min}$.

3.2. Hemodinâmica renal

Os dados do fluxo sanguíneo renal, pressão arterial média e resistência vascular renal são apresentados na Tabela 1. O FSR dos grupos tratados, DS $5,84 \pm 0,3$ ml/min, RO $6,45 \pm 0,4$ ml/min, FK $5,43 \pm 0,3$ ml/min, FK+DS $6,07 \pm 0,3$ ml/min e FK+RO $6,35 \pm 0,5$ ml/min não apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo Contr ($6,53 \pm 0,4$ ml/min).

A PAM e a RVR não apresentaram variação estatística significativa entre os grupos tratados e o controle. (Tabela 1 e Figura 3)

Tabela 1. Comparação dos dados de Ritmo de Filtração Glomerular (clearance de inulina), Fluxo Sanguíneo Renal, Pressão Arterial Média, Resistência Vascular Renal e Volume Urinário entre os grupos de ratos tratados.

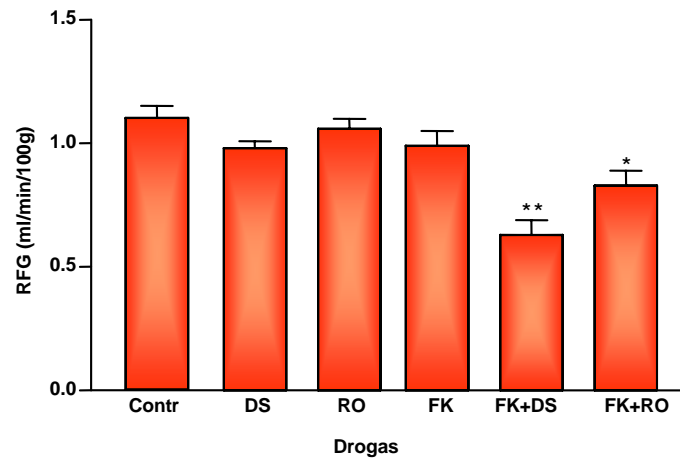
PARÂMETROS	Contr	DS (10 mg/kg/dia)	RO (3 mg/kg/dia)	FK (2 mg/kg/dia)	FK+DS	FK + RO
Cin (ml/min/100g)	1,10 ± 0,05	0,98 ± 0,03	1,06 ± 0,04	0,99 ± 0,05	0,63 ± 0,06*	0,83 ± 0,06**
(n)	(10)	(10)	(10)	(10)	(13)	(12)
FSR (ml/min)	6,53 ± 0,4	5,84 ± 0,3	6,45 ± 0,4	5,43 ± 0,3	6,07 ± 0,3	6,35 ± 0,5
(n)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)
PAM (mmHg)	132 ± 4	130 ± 5	130 ± 4	118 ± 3	127 ± 4	125 ± 3
(n)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)
RVR (mmHg/ml/min)	20,8 ± 1,5	22,7 ± 0,9	21,2 ± 1,9	22,5 ± 1,4	21,8 ± 1,7	22,1 ± 3,6
(n)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)
VU (µl/min)	12,11 ± 1,52	10,71 ± 0,87	12,99 ± 1,22	11,71 ± 0,84	8,38 ± 0,46***	10,16 ± 1,32
(n)	(10)	(10)	(10)	(10)	(13)	(12)

Os dados apresentam médias±erro padrão da média (SEM). Abreviações: DS (diclofenaco sódico), RO (rofecoxib), Contr (controle), FK (FK 506 – Tacrolimus), Cin (clearance de inulina), FSR (fluxo sanguíneo renal), PAM (pressão arterial média), RVR (resistência vascular renal), VU (volume urinário).

* Cin p < 0,001 versus Contr, DS, RO, FK e p < 0,01 versus FK+RO

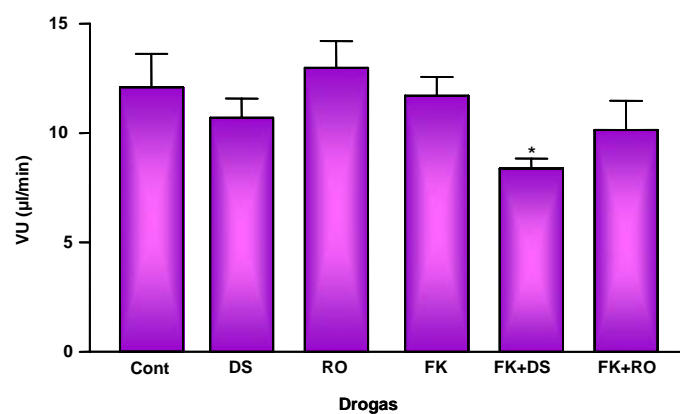
** Cin p < 0,05 versus Contr, RO

*** VU p < 0,05 versus RO



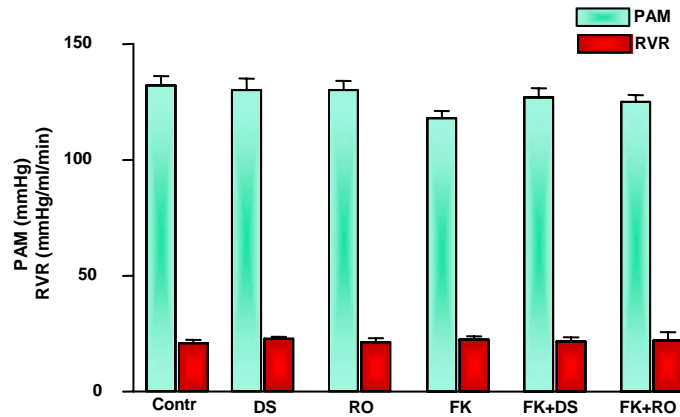
Os dados representam média \pm erro padrão da média (SEM). Abreviações: Contr (controle), DS (diclofenaco sódico), RO (rofecoxib), FK (FK506-tacrolimus); *FK+RO $p < 0,05$ vs Contr e RO ** FK+DS $p < 0,001$ vs Contr, DS, RO e FK $p < 0,01$ vs FK+RO.

Figura 1. Filtração Glomerular nos grupos estudados.



Os dados representam média \pm erro padrão da média (SEM). Abreviações: Contr (controle), DS (diclofenaco sódico), RO (rofecoxib), FK (FK506-tacrolimus); *FK+DS $p < 0,05$ vs RO.

Figura 2. Volume Urinário nos grupos estudados.



Os dados representam média \pm erro padrão da média (SEM). Abreviações: Contr (controle), DS (diclofenaco sódico), RO (rofecoxib), FK (FK506-tacrolimus).

Figura 3. Pressão Arterial Média e Resistência Vascular Renal nos grupos estudados.

3.3. Depuração de solutos

As concentrações de sódio e potássio plasmáticos (P Na) e (P K), a osmolaridade plasmática (P Osm) e o clearance de creatinina (Ccreat) não apresentaram variações estatisticamente significantes entre os grupos. (Tabela 2).

A fração de excreção de sódio (FE Na) do grupo RO $0,128 \pm 0,03$ % foi significativamente maior quando comparada com os grupos Contr $0,024 \pm 0,01$ % , FK $0,020 \pm 0,01$ % e FK+DS $0,012 \pm 0,004$ % ($p < 0,05$), mas não com os grupos DS $0,072 \pm 0,04$ % e FK+RO $0,047 \pm 0,02$ %. (Tabela 3)

A fração de excreção de potássio (FE K), a osmolaridade urinária (U Osm) e transporte de água livre (T CH_2O) tiveram valores semelhantes entre os grupos, sem diferenças estatísticas significantes. (Tabela 3)

Tabela 2. Comparação dos dados de Concentração de Sódio e Potássio no Plasma, Osmolaridade plasmática e Clearance de creatinina entre os grupos de ratos tratados.

PARÂMETROS	Contr	DS (10 mg/kg/dia)	RO (3 mg/kg/dia)	FK (2 mg/kg/dia)	FK+DS	FK + RO
P Na						
(mEq / l)	145 ± 1,1	144 ± 1	144 ± 1,3	141 ± 1,6	141 ± 1,8	141 ± 1
(n)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)
P K						
(mEq / l)	3,4 ± 0,05	3,6 ± 0,05	3,6 ± 0,07	3,5 ± 0,07	3,8 ± 0,15	4 ± 0,23
(n)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)
P Osm						
(mOsm / Kg)	291 ± 10	300 ± 2	294 ± 1,7	295 ± 10,5	299 ± 6,7	303 ± 2,5
(n)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)
Ccreat						
(ml / min/100g)	0,40 ± 0,03	0,35 ± 0,02	0,37 ± 0,03	0,43 ± 0,04	0,44 ± 0,03	0,43 ± 0,03
(n)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)

Os dados apresentam médias ± erro padrão da média (SEM). Abreviações: DS (diclofenaco sódico), RO (rofecoxib), Contr (controle), FK (FK 506 – Tacrolimus), P Na (concentração de sódio no plasma), P K (concentração de potássio no plasma), P Osm (osmolaridade plasmática); Ccreat (clearance de creatinina).

Tabela 3. Comparação dos dados de Fração de Excreção de Sódio, Fração de Excreção de Potássio, Osmolaridade da urina e Transporte de Água Livre entre os grupos de ratos tratados.

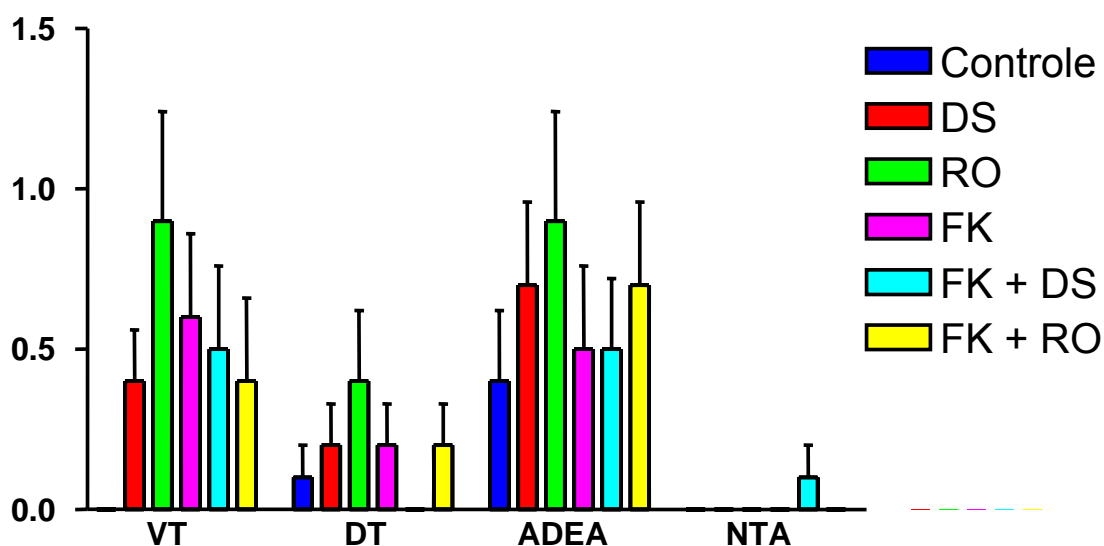
PARÂMETROS	Contr	DS (10 mg/kg/dia)	RO (3 mg/kg/dia)	FK (2 mg/kg/dia)	FK+DS	FK + RO
FE Na						
(%)	0,024 ± 0,01	0,072 ± 0,04	0,128 ± 0,03*	0,020 ± 0,01	0,012 ± 0,004	0,047 ± 0,02
(n)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)
FE K						
(%)	13,8 ± 3,1	14,2 ± 1,3	13,7 ± 1,7	14,8 ± 1,3	17 ± 2,2	20,8 ± 3,6
(n)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)
U Osm						
(mOsm / Kg)	1257 ± 72	1439 ± 120	1292 ± 63	1190 ± 56	1161 ± 114	1139 ± 117
(n)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)
Tc H2O						
(ml / min)	0,015 ± 0,003	0,022 ± 0,003	0,015 ± 0,001	0,021 ± 0,02	0,025 ± 0,003	0,021 ± 0,002
(n)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)

Os dados apresentam médias ± erro padrão da média (SEM). Abreviações: DS (diclofenaco sódico), RO (rofecoxib), Contr (controle), FK (FK 506 – Tacrolimus), FE Na (fração de excreção de sódio), FE K (fração de excreção de potássio), U Osm (osmolaridade da urina), Tc H2O (transporte de água livre); * RO $p < 0,05$ versus FK+DS, FK, Contr.

3.4. Histologia

Os dados de histologia são apresentados na tabela 4, não havendo alterações significativas entre os grupos tratados e o controle. Foram observadas alterações leves como: vacuolização e dilatação tubular, alterações degenerativas epiteliais agudas e necrose tubular aguda.

(Tabela 4 e Figuras 4, 5, 6, 7, 8).



Os dados representam média \pm erro padrão da média (SEM); Abreviações: DS (diclofenaco sódico), RO (rofecoxib), FK (FK 506 - tacrolimus), VT (vacuolização tubular), DT (dilatação tubular), ADEA (alteração degenerativa e epitelial aguda), NTA (necrose tubular aguda).

Figura 4. Alterações histológica nos grupos estudados.

Tabela 4. Comparação dos dados histológicos entre os grupos de ratos tratados.

PARÂMETROS	Contr	DS (10 mg/kg/dia)	RO (3 mg/kg/dia)	FK (2 mg/kg/dia)	FK+DS	FK + RO
(VT) (n)	0 (10)	0,4 ± 0,1 (10)	0,9 ± 0,3 (10)	0,6 ± 0,2 (10)	0,5 ± 0,2 (10)	0,4 ± 0,2 (10)
(DT) (n)	0,1 ± 0,1 (10)	0,2 ± 0,1 (10)	0,4 ± 0,2 (10)	0,2 ± 0,1 (10)	0 (10)	0,2 ± 0,1 (10)
(ADEA) (n)	0,4 ± 0,2 (10)	0,7 ± 0,2 (10)	0,9 ± 0,3 (10)	0,5 ± 0,2 (10)	0,5 ± 0,2 (10)	0,7 ± 0,2 (10)
(NTA) (n)	0 (10)	0 (10)	0 (10)	0 (10)	0,1 ± 0,1 (10)	0 (10)

Os dados apresentam médias ± erro padrão da média (SEM). Abreviações: DS (diclofenaco sódico), RO (rofecoxib), Contr (controle), FK (FK 506 – Tacrolimus), VT (vacuolização tubular), DT (dilatação tubular), ADEA (alteração degenerativa epitelial aguda), NTA (necrose tubular aguda).

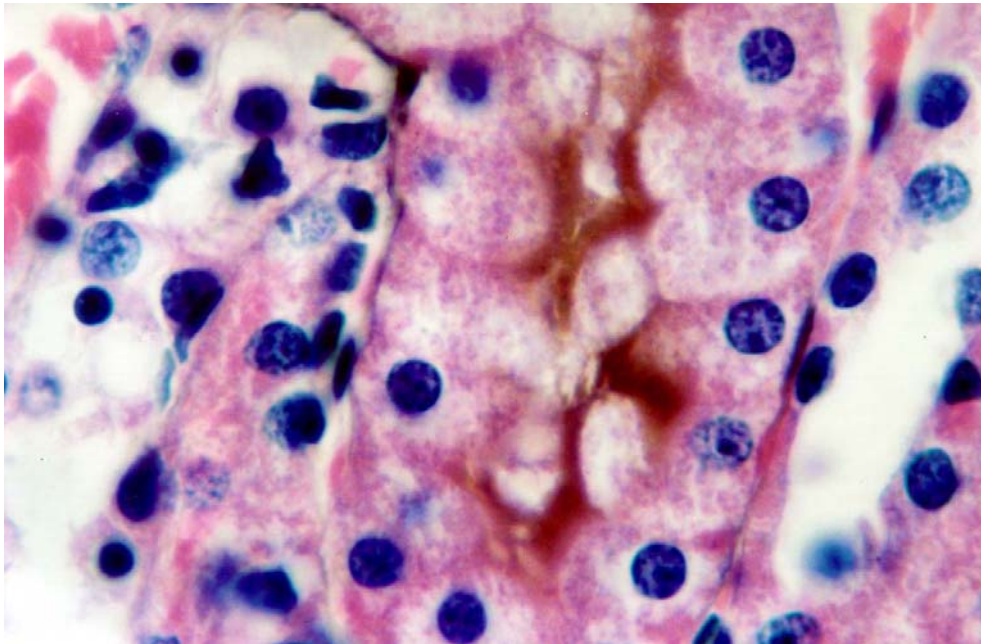


Figura 5. Corte histológico renal apresentando leves alterações de vacuolização tubular, coloração por Periodic Acid Methenamine Silver (PAMS) X 1000.

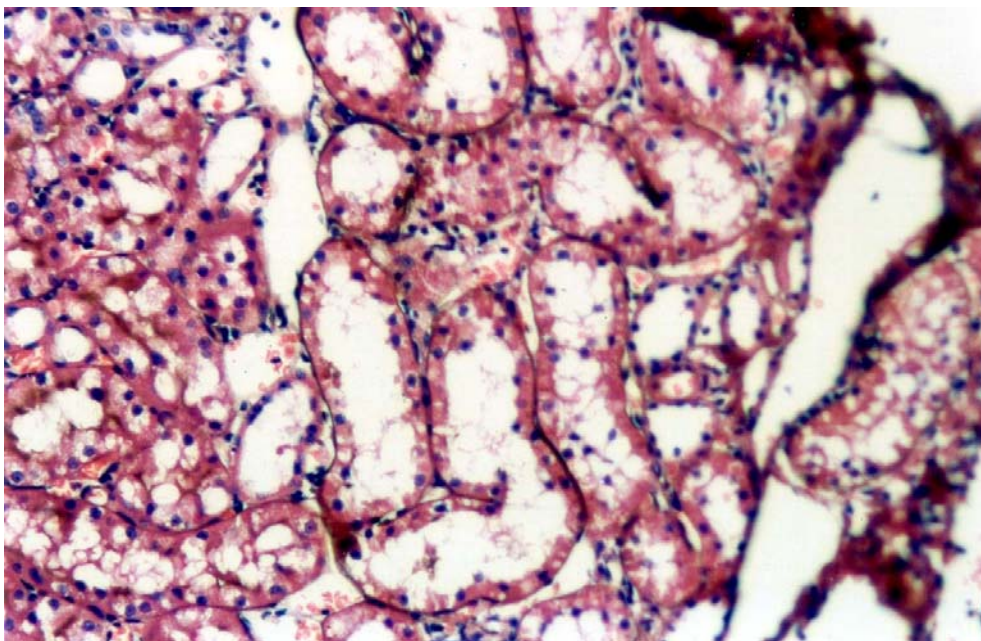


Figura 6. Corte histológico renal apresentando leves alterações de dilatação tubular, coloração por Periodic Acid Methenamine Silver (PAMS) X 400.

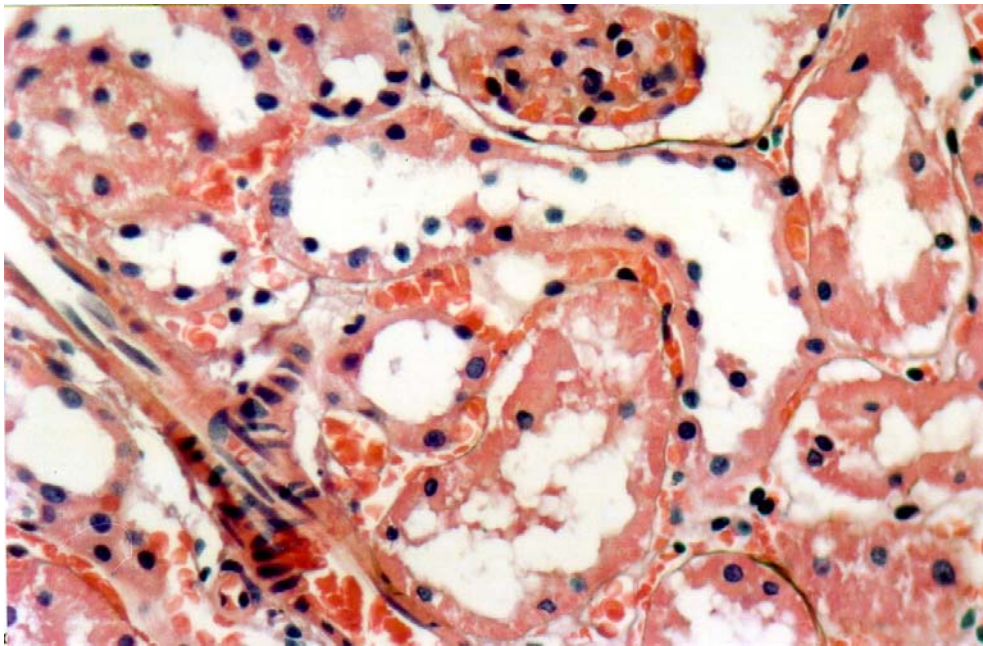


Figura 7. Corte histológico renal apresentando leves alterações degenerativas epiteliais agudas, coloração por Periodic Acid Methenamine Silver (PAMS) X 400.

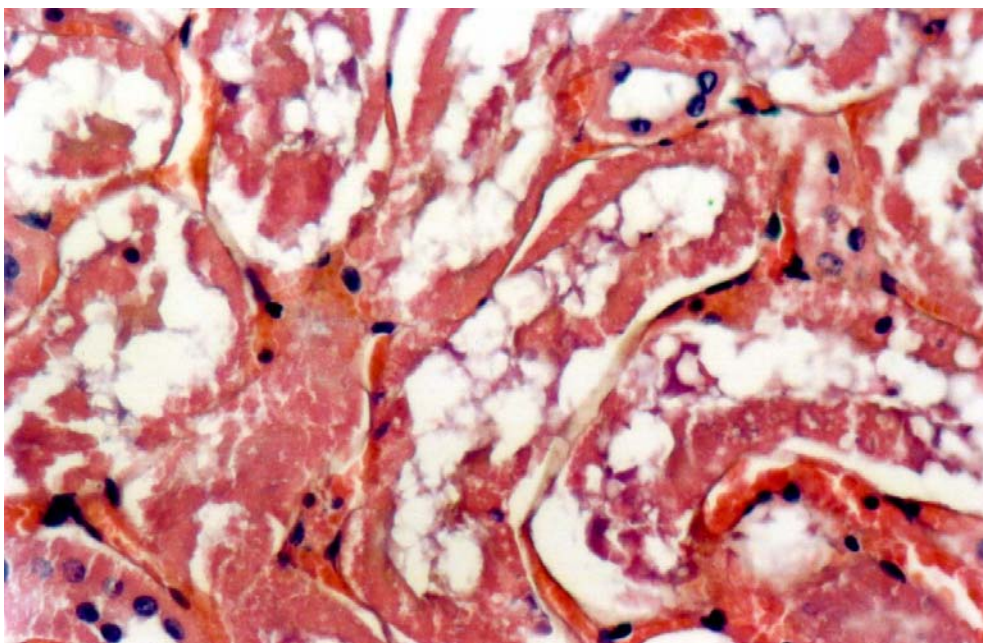
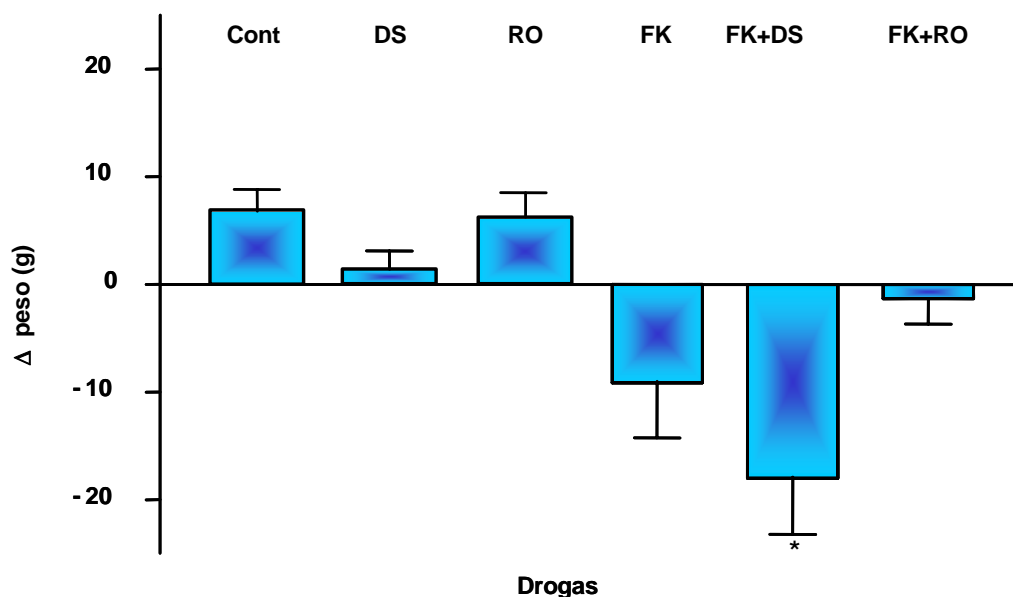


Figura 8. Corte histológico renal apresentando leves alterações de necrose tubular aguda, coloração por Periodic Acid Methenamine Silver (PAMS) X 400.

3.5. Peso

As médias dos pesos dos ratos do início do tratamento até o dia do experimento apresentaram variações, com perda de peso dos ratos dos grupos tratados com FK (-9 ± 5 g), FK+DS (-18 ± 5 g) e FK+RO (-1 ± 2 g). Para o grupo FK+DS a perda de peso foi estatisticamente significativa em relação aos grupos Contr (6 ± 2 g, $p < 0,001$), RO (5 ± 2 g, $p < 0,001$), DS ($0,2\pm 4$ g, $p < 0,01$) e FK+RO (-1 ± 2 g, $p < 0,01$). Para os grupos FK e FK+RO, as perdas médias de peso no período de tratamento não foram estatisticamente significativas quando comparadas aos grupos Contr, DS e RO. (Figura 9)

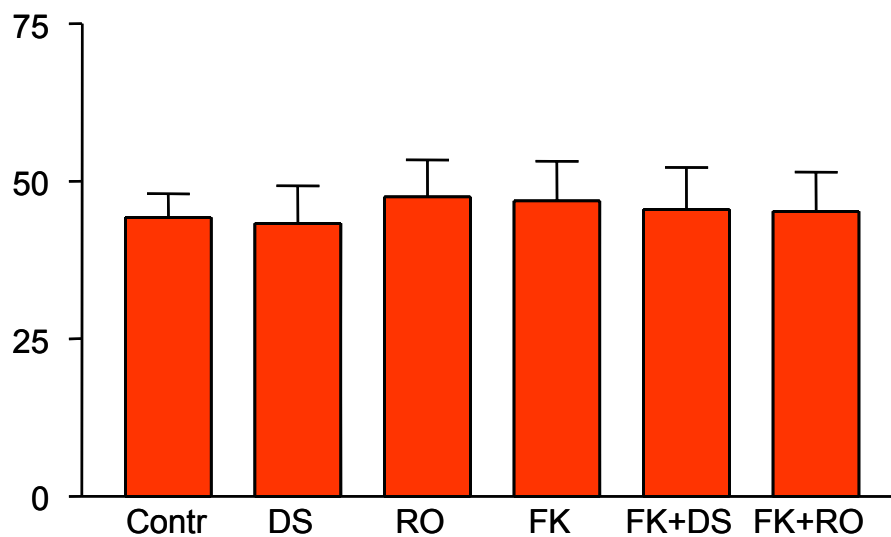


Os dados representam médias \pm erro padrão da média (SEM). Abreviações: Contr (controle), DS (diclofenaco sódico), RO (rofecoxib), FK (FK 506-tacrolimus); * peso – FK + DS $p < 0,001$ vs Contr e RO $p < 0,01$ vs DS e FK + RO.

Figura 9. Variação de peso dos ratos nos grupos estudados.

3.6. Hematócrito

O hematócrito não apresentou variações das médias entre os grupos tratados e o grupo controle, sendo os valores, Contr $44 \pm 1,2$ %, DS $43 \pm 1,8$ %, RO $47 \pm 1,8$ %, FK 47 ± 2 %, FK+DS 45 ± 2 %, FK+RO $45 \pm 1,9$ %. (Figura 10)

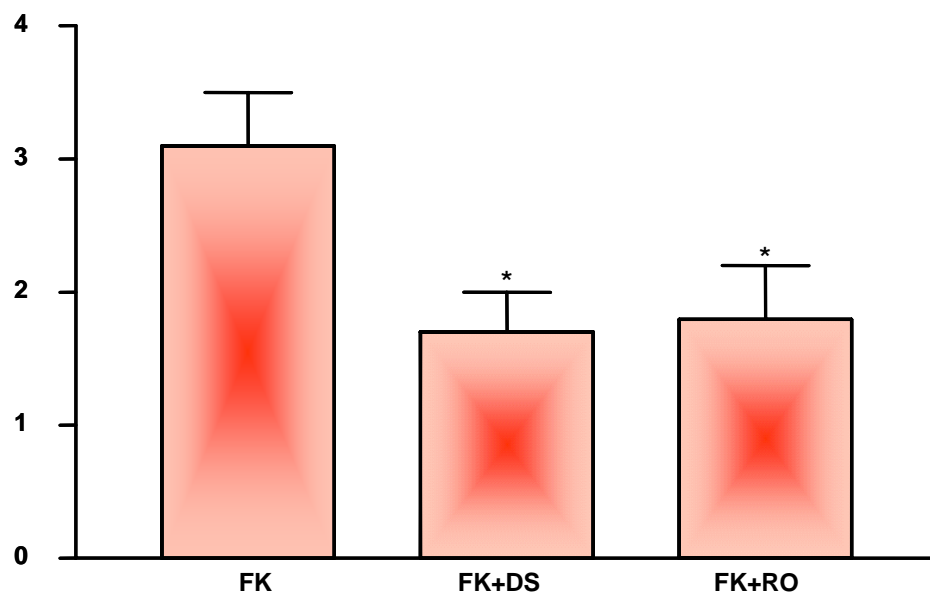


Os dados representam médias \pm erro padrão da média (SEM). Abreviações: Contr (controle), DS (diclofenaco sódico), RO (rofecoxib), FK (FK 506-tacrolimus).

Figura 10. Hematócrito dos ratos nos grupos estudados.

3.7. Concentração sanguínea de FK 506 (CSFK)

A concentração sanguínea de FK 506 diminuiu significativamente ($p < 0,05$) para os grupos FK+DS e FK+RO ($1,7 \pm 0,3$ ng/ml e $1,8 \pm 0,4$ ng/ml respectivamente) em relação ao grupo FK ($3,2 \pm 0,4$ ng/ml). (Figura 11)



Os dados representam médias \pm erro padrão da média (SEM). Abreviações: FK (FK 506-tacrolimus), DS (diclofenaco sódico), RO (rofecoxib); * CSFK - FK+DS e FK+RO $p < 0,05$ versus FK.

Figura 11. Concentração sanguínea de FK (CSFK) dos ratos nos grupos estudados.

4. DISCUSSÃO

4. DISCUSSÃO

O efeito colateral mais importante do FK 506 é o nefrotóxico, sendo a nefrotoxicidade aguda atribuída a sua ação no metabolismo das prostaglandinas, predominando o efeito de prostanóides vasoconstrictores com aumento da resistência vascular renal e redução do fluxo sanguíneo renal e da filtração glomerular.^(38,39,41,85) No presente estudo, a dose administrada de FK 506 foi de 2 mg/kg/dia durante 7 dias, associada a dieta hipossódica. A dosagem padronizada não causa efeitos nefrotóxicos agudos em ratos, conforme modelo experimental para nefrotoxicidade aguda e crônica do FK 506, realizado por Burdmann *et al.*⁽³⁴⁾ Estudos experimentais evidenciam que a dieta pobre em sal provoca a ativação do sistema renina-angiotensina, vasoconstrição renal e isquemia medular, estimulando a fibrose tubulointersticial.^(44,86) No presente estudo, em ratos com dieta hipossódica, não foram observadas diferenças no RFG, FSR, RVR e PAM entre os grupos FK 506 e controle. A associação do FK 506 com AINHS provocou significativa queda do RFG em relação ao controle, sendo de 43% para a associação com o diclofenaco sódico e de 25% para a associação com o rofecoxib, inibidor seletivo da COX-2. A diminuição do RFG verificada no grupo FK+DS foi altamente significativa ($p < 0,001$) quando comparada com as drogas administradas isoladamente e com o controle, observando-se diferença significativa ($p < 0,01$) entre os grupos FK+DS e FK+RO. Nesse último grupo, o RFG diminuiu significativamente ($p < 0,05$) com relação aos grupos controle e RO. A diminuição observada na filtração glomerular não foi acompanhada de

mudanças no fluxo sanguíneo renal, resistência vascular renal e pressão arterial média. (Tabela 1 e Figuras 1 e 3).

Os efeitos do FK na função renal estão relacionados à vasoconstrição das arteríolas aferentes e eferentes, que ocorre devido à secreção de eicosanóides vasoconstrictores e inibição da calcineurina fosfatase renal. Textor *et al.* relataram que o tacrolimus diminuiu a 6-keto-PGF_{1α} em pacientes com transplante de fígado.⁽⁸⁷⁾ Em ratos SHR, a nefrotoxicidade aguda pelo tacrolimus está associada com o aumento do TXB₂ urinário e diminuição da 6-keto-PGF_{1α}.⁽⁸⁸⁾ Recentemente Butani *et al.* mostraram que a suplementação com óleos biológicos ricos em ácidos graxos ômega 3, que aumentam a síntese de prostanóides vasodilatadores, preveniu a diminuição do RFG em ratos tratados com tacrolimus.⁽⁸⁹⁾ Em nosso trabalho, a não-modificação nos parâmetros de função renal no grupo FK em relação ao controle pode ser atribuída aos mecanismos compensatórios renais para a manutenção da homeostase. Os estímulos vasoconstrictores provocados pelo FK desencadeiam mecanismos compensadores, liberando prostaglandinas vasodilatadoras que controlam o tônus vascular renal e a resistência pré-glomerular e mantêm a filtração glomerular em níveis normais.^(41,90,91) Nos rins, as prostaglandinas são sintetizadas em diferentes segmentos do nefron com estruturas e funções altamente especializadas. No córtex, os locais de produção das PGs são as artérias, arteríolas e capilares glomerulares, onde exercem importante função na manutenção do fluxo sanguíneo renal e filtração glomerular. Na medula, as células intersticiais são produtoras de PGs, que têm o papel de manter o fluxo sanguíneo nessa região de baixa oxigenação e

hipertonicidade.⁽⁹²⁾ A PGE₂ é a mais importante PG encontrada nos túbulos, principalmente os medulares. Secretada pelas células medulares intersticiais, modula o transporte de sódio e cloro na alça de Henle, indiretamente o transporte de água nos coletores e o fluxo sanguíneo na vasa recta. A PGI₂ é a mais abundante do córtex, sintetizada pelas arteríolas corticais e capilares glomerulares. É importante na regulação do tônus vascular renal, da filtração glomerular e modula a secreção de renina.⁽⁹³⁾

Os AINHs estão associados aos efeitos tóxicos renais, principalmente por interferir na hemodinâmica renal e na homeostase de fluidos e eletrólitos. Sua adequada utilização, entretanto, produz efeitos moderados, transitórios e reversíveis. As complicações mais graves, como a nefrite intersticial e a necrose papilar, são raras e freqüentemente irreversíveis.⁽⁵⁶⁾ No presente estudo, a administração isolada dos AINHs, o diclofenaco sódico, inibidor não-seletivo da COX e o rofecoxib, inibidor seletivo da COX-2, não causou modificações na hemodinâmica renal ou na filtração glomerular, mesmo com dieta hipossódica (Tabela 1 e Figuras 1 e 3). Esses resultados sugerem que a administração de AINHs com dieta hipossódica em condições euvolêmicas não alterou os mecanismos compensatórios renais dependentes das prostaglandinas. O bloqueio de ambas isoformas da COX pelo diclofenaco sódico e seletivamente da COX-2 pelo rofecoxib não foi suficiente para causar alterações renais, provavelmente devido ao curto tempo de administração (7 dias). A ação renal dos AINHs depende da inibição da COX, enzima envolvida no metabolismo do ácido aracdônico para a síntese das prostaglandinas, que têm papel fundamental na hemodinâmica renal. A administração de AINHs

bloqueia a síntese de PGs, ocorrendo diminuição do fluxo sanguíneo renal e da filtração glomerular, sendo esta última mais afetada. A diminuição da filtração glomerular reduz a carga filtrada de sódio, resultando em retenção de sódio e água.⁽⁵⁸⁾ Estudos experimentais com modelos animais têm demonstrado que a síntese das PGs é essencial para a manutenção da função renal. Condições que aumentam o estímulo vasoconstrictor neuro-endócrino são considerados "estados renais PG-dependentes", e nessa situação, o bloqueio da síntese das PGs vasodilatadoras pelos AINHs, altera dramaticamente a função renal.⁽⁹⁴⁾ Várias condições são responsáveis pelo "estado renal PG-dependente". Estudos realizados em animais e humanos evidenciam várias dessas situações, tais como depleção de sódio, diminuição do débito cardíaco, cirrose hepática, obstrução do trato urinário, redução da massa renal e síndrome nefrótica.^(62,95-110) A nefrotoxicidade causada por drogas também provoca o "estado renal PG-dependente", como o uso de aminoglicosídeos.^(111,112) Os imunossupressores, como a ciclosporina e FK 506 causam nefrotoxicidade aguda, aumentando a resistência vascular renal, com diminuição do FSR e RFG. Em modelos experimentais existem evidências de que as PGs vasodilatadoras são liberadas para minimizar esses efeitos tóxicos renais.^(38,39,93,113,114)

Em humanos, a incidência de insuficiência renal aguda em pacientes tratados com AINHs não está bem determinada.⁽¹¹⁵⁾ O uso de AINHs pode causar IRA, particularmente em idosos na vigência de hipovolemia e comorbidades.^(116,117) Nos idosos ocorre diminuição do ritmo de filtração glomerular, diminuição do fluxo sanguíneo renal e aumento da resistência

vascular, fatores que determinam o “estado renal PG-dependente”, verificando-se piora da função renal com o uso de AINHs.^(118,119)

Pesquisas visando à síntese de AINHs com efetivas propriedades antiinflamatórias associada a menor nefrotoxicidade, principalmente para a população com os fatores de risco ou “estado renal PG-dependente”, têm sido realizadas. A partir da pesquisa de Vane *et al.*⁽⁵³⁾ na década de 70, duas isoformas da COX foram caracterizadas e, em 1991 foram confirmados dois genes que codificam as isoformas COX-1 e COX-2.⁽¹²⁰⁻¹²²⁾ Os AINHs não-seletivos inibem simultaneamente a COX-1 e COX-2 e, a inibição da COX-1 provoca efeitos colaterais importantes, como ulceração gastrointestinal e sangramento, limitando seu uso na prática clínica.^(54,55,123,124) Em 1999, drogas do grupo coxib, que inibem seletivamente a COX-2, como o celecoxib e rofecoxib foram introduzidos na prática médica, como uma nova classe de antiinflamatórios com eficácia equivalente aos tradicionais, e menores efeitos gastrointestinais.⁽¹²⁵⁻¹²⁷⁾ Entretanto, em relação aos efeitos renais, existem evidências de que essa nova classe de AINHs tem potencial para causar alterações renais semelhantes aos tradicionais, em situações em que as PGs renais são necessárias à manutenção da homeostase.^(74-85,128-132)

No presente estudo, as associações FK 506 e diclofenaco sódico e FK 506 e rofecoxib provocaram diminuição da filtração glomerular, o que não ocorreu com as drogas administradas isoladamente. Pode-se inferir que a administração do FK 506 com dieta hipossódica promoveu um “estado renal PG-dependente”, com conseqüente queda da filtração glomerular quando associado aos AINHs. Verificamos que a diminuição do RFG para o grupo

FK+DS foi altamente significativa quando comparada com os grupos em que as drogas foram administradas isoladamente e o grupo controle ($p < 0,001$) e significativa ($p < 0,01$) quando comparada com o grupo FK+RO. No grupo FK+RO o RFG diminuiu significativamente ($p < 0,05$) em relação aos grupos controle e RO. O maior efeito nefrotóxico da associação do FK 506 com o diclofenaco sódico, inibidor não-seletivo da COX, pode ser explicado pela distribuição das enzimas COX-1 e COX-2 no tecido renal. Estudos em humanos e em animais de laboratório demonstraram diferenças na nefrotoxicidade relacionada aos AINHs, associada com as diversas expressões das isoformas da COX nos rins, conforme as espécies. Khan *et al.*, através de procedimento com imunohistoquímica, estudaram a localização da COX-1 e COX-2 no tecido renal de cães, ratos, macacos e humanos. A COX-1 apresentou imunorreatividade na vasculatura renal, ductos coletores e células intersticiais papilares de todas as espécies, com variação de intensidade apenas nos ductos coletores, mais intensa em cães e ratos. A localização da COX-2 mostrou diferenças entre as espécies estudadas, estando presente no ramo ascendente espesso da alça de Henle, mácula densa e células intersticiais papilares, nos cães e ratos e nos podócitos glomerulares e vasculatura renal em macacos e humanos.⁽¹³³⁾ Em nosso estudo a diminuição importante do RFG no grupo FK+DS pode ter ocorrido, pela inibição da COX-1 presente na vasculatura renal, com o conseqüente bloqueio da geração de prostaglandinas vasodilatadoras que contrabalançariam o estímulo vasoconstrictor provocado pelo FK 506 em presença de dieta hipossódica. A queda da filtração glomerular verificada com a associação FK 506 e DS sem a

concomitante diminuição do FSR ou aumento a RVR poderia ser explicada pela contração das células mesangiais com conseqüente diminuição do coeficiente de filtração (Kf). Hadad *et al.* demonstrou que a administração do tacrolimus in bolus ou intraperitoneal por 10 dias causou significativa redução do Kf em ratos. O mesmo fato ocorreu com a adição do tacrolimus em cultura de células mesangiais causando 50% de redução da área celular.⁽⁸⁵⁾ A contração das células mesangiais glomerulares pode ocorrer pela ação da angiotensina II, endotelina, arginina vasopressina (AVP) e fator ativador de plaquetas, diminuindo a área total da superfície capilar glomerular, com conseqüente diminuição do RFG.⁽⁶²⁾ As prostaglandinas têm um papel fundamental para contrabalançar esse efeito constrictor nas células mesangiais. As células mesangiais sintetizam e secretam a PGI₂ (humanos) e PGE₂ (ratos), minimizando o efeito constrictor desses hormônios, mantendo a área de superfície capilar glomerular e a filtração glomerular.⁽¹³⁴⁻¹³⁷⁾ A administração de FK 506 e rofecoxib também provocou a queda significativa do RFG quando comparada com os grupos Contr e RO (p<0,05), sem modificações do FSR e RVR. No grupo FK+DS, entretanto, a queda do RFG foi significativamente maior que no grupo FK+RO (p<0,01). No grupo FK+DS provavelmente ocorreu a inibição da COX-1 presente nas células mesangiais glomerulares com conseqüente diminuição das PGs vasodilatadoras e diminuição do Kf. Entretanto, no grupo FK+RO, em que ocorre a inibição seletiva da COX-2 essa justificativa não se aplicaria, pois nos glomérulos e na vascularura renal de ratos a COX-2 não está expressa como ocorre em primatas não-humanos e humanos.⁽¹³³⁾ Apesar das evidências imunohistoquímicas da localização da

COX-2 em ratos na mácula densa, ramo ascendente espesso cortical e células intersticiais medulares, é possível a expressão dessa enzima nos glomérulos, em níveis inferiores aos detectados em outras espécies. A presença da COX-2 em glomérulos de ratos em níveis mais baixos poderia explicar a diminuição menos intensa na filtração glomerular no grupo FK+RO. Outra possibilidade seria de que os inibidores seletivos da COX-2 não apresentam seletividade total, podendo ocorrer bloqueio parcial da COX-1. Van Hecken *et al.* em estudo comparando a atividade inibitória de alguns AINHs sobre a COX-1 e COX-2, verificou, para o rofecoxib 25 mg, que a inibição da COX-1 ocorreu em 6,65% e para a COX-2 69,2%, mostrando a seletividade para a COX-2, porém pequena proporção de inibição da COX-1.⁽¹²⁵⁾

No presente estudo, verificamos uma tendência à diminuição da diurese nos grupos tratados com associação de drogas, sendo significativa ($p < 0,05$) somente no grupo FK+DS comparado com o grupo RO. (Tabela 1 e Figura 2). A fração de excreção de sódio foi significativamente maior no grupo RO ($p < 0,05$) quando comparado com os grupos FK+DS, FK e Contr. (Tabela 3) Diferentemente dos dados de literatura, o rofecoxib não provocou o efeito antinatriurético, mas sim o aumento da fração de excreção de sódio. O efeito antidiurético e antinatriurético dos AINHs inibidores seletivos e não-seletivos da COX tem sido evidenciado por estudos experimentais e clínicos.^(71-74,138,139) Muscara *et al.* estudaram o efeito do celecoxib administrado em ratos normais e hipertensos por um período de 3 semanas. Houve aumento da pressão arterial em 25% dos casos, associada à retenção de fluídos, sem modificações nos níveis da creatinina plasmática.⁽⁷¹⁾ A administração do inibidor específico

da COX-2, o MF-tricíclico, não afetou a hemodinâmica renal ou a função excretora em cães normovolêmicos ou depletados em volume. No entanto, a administração de indometacina induziu a significativa vasoconstrição nos animais com depleção de volume.⁽⁷³⁾ Rodriguez *et al.* mostraram em estudo realizado em cães com dieta normal em sal que o nimesulide, inibidor seletivo da COX-2, não alterou a pressão arterial ou a hemodinâmica renal, mas diminuiu a diurese e natriurese. Nos animais com dieta hipossódica, ocorreu retenção de água e sódio, significativa vasoconstrição e elevação da pressão arterial sistêmica.⁽¹³⁸⁾ Nos estudos clínicos, tem sido relatada a importância da COX-2 no manuseio renal do sódio e água, verificando-se efeitos renais diferentes quando comparados os AINHs inibidores não-seletivos da COX, sugerindo uma condição de dependência renal das PGs.^(139,140) Whelton *et al.*, após estudo clínico em idosos saudáveis, concluíram que o inibidor seletivo da COX-2 não acarretou alterações hemodinâmicas semelhantes aos AINHs tradicionais, mas os efeitos tubulares na reabsorção de sódio e água foram similares nos 2 grupos.⁽⁷⁴⁾ Outros estudos clínicos sugerem que os inibidores seletivos da COX-2 causam alterações renais semelhantes aos AINHs tradicionais, verificando-se queda da filtração glomerular e efeito antidiurético e antinatriurético em situações clínicas em que os rins dependem da ação compensatória das PGs.^(75,128,129,141-143) Os AINHs não-seletivos bloqueiam a COX-1 e diminuem as concentrações de prostaglandinas na medula e papila renais, provocando alterações no transporte de fluidos e eletrólitos. Os AINHs inibidores seletivos da COX-2 apresentam diferentes ações conforme sua localização nas diferentes espécies estudadas. Em cães e ratos, a

predominância da COX-2 na mácula densa, interstício e ramo ascendente espesso da alça de Henle, libera PGs envolvidas com a regulação da secreção de renina. Nos primatas, essa isoforma da COX predomina nos glomérulos e tem influência na hemodinâmica renal e filtração glomerular. Estudo em ratos com dieta pobre em sal mostrou aumento de 3 vezes nos níveis de imunoreatividade da COX-2 na mácula densa e ramo ascendente espesso cortical da alça de Henle quando comparado com animais com dieta normal em sal.⁽⁷⁰⁾ As diferentes funções mediadas pelas PGs derivadas da COX-2 no córtex e medula têm importância na preservação da função renal durante a depleção de volume e promove resposta diurética e natriurética durante a expansão de volume.⁽⁵¹⁾ Essa diferente distribuição da COX-2 renal entre as espécies dificulta a extrapolação dos resultados observados em animais de laboratório para os humanos. No entanto, devido à ampla distribuição da COX-2 nos rins de cães e ratos, essas espécies têm sido utilizadas para estudar a função dessa enzima em diferentes porções do nefron.⁽¹³³⁾

As alterações histológicas foram de grau leve e ocorreram em 66% dos animais tratados. Os dados histológicos apresentados na Tabela 4 e Figura 4 mostram leves alterações tubulares em todos os grupos. Foram visualizadas vacuolização tubular (Figura 5), dilatação tubular (Figura 6), alteração degenerativa epitelial aguda (Figura 7). A necrose tubular aguda de grau leve (Figura 8) foi observada em apenas um animal do grupo FK+DS. A nefrotoxicidade aguda do FK 506 não causa mudanças estruturais importantes nos rins e esses efeitos agudos são reversíveis com a redução da dose.⁽¹⁴⁴⁾ Raramente a diminuição aguda do RFG está associada a mudanças

histológicas permanentes.⁽¹⁴⁵⁾ Estudos morfológicos sobre os efeitos renais causados pelo FK 506 em transplantes não renais ou doenças autoimunes são escassos. As alterações histológicas observadas são semelhantes às encontradas com a CsA, sendo a vacuolização tubular um dos marcadores precoces da nefrotoxicidade.^(30,32) Em nosso trabalho, a vacuolização tubular foi leve e ocorreu em todos os grupos com exceção do controle. A associação do FK 506 com o diclofenaco sódico ou o rofecoxib não aumentou a ocorrência de alterações histológicas. De fato na nefrotoxicidade aguda causada pelo FK 506 e AINHs as alterações estruturais renais são leves e não específicas e raramente ocorre necrose tubular aguda.^(41,146,147)

Em nosso estudo verificamos a tendência de queda no peso dos animais nos grupos que receberam FK (-9±5 g), FK+DS (-18±5 g), FK+RO (-1±2 g) sendo estatisticamente significativa no grupo FK+DS com relação ao Contr (6±2 g, p<0,001), RO (5±1 g, p<0,001), DS (0,2±4 g, p<0,01) e FK+RO (-1±2 g, p<0,01). (Figura 9). Esses dados sugerem uma maior toxicidade dos inibidores não-seletivos da COX. A COX-1 tem, entre outras, a função fisiológica de citoproteção da mucosa gástrica e os AINHs inibidores não-seletivos da COX, conforme os dados da literatura, causam efeitos tóxicos como ulceração gastrointestinal e sangramento.^(54,55,123,124) Em nosso estudo não foi observado sangramento gastrointestinal nos animais, fato corroborado pelo hematócrito (Figura 10), com médias estáveis em todos os grupos entre 43% e 47%. Esse fato sinaliza também para as boas condições clínicas dos animais, após os procedimentos cirúrgicos que foram realizados com pouco sangramento, proporcionando condições adequadas para os estudos fisiológicos renais.

Outro fato importante é que a manutenção estável do hematócrito garantiu a dosagem correta da concentração sanguínea do FK 506 (CSFK), que utiliza sangue total para a realização do teste Elisa com anticorpo monoclonal. (DiaSorin PRO-Trac™ II Tacrolimus-Stillwater, Minnesota, USA).

A concentração sanguínea do FK 506 diminuiu significativamente quando associado aos outros fármacos, nos grupos FK+DS ($1,7 \pm 0,3$ ng/ml, $p < 0,05$) e FK+RO ($1,8 \pm 0,4$ ng/ml, $p < 0,05$) em relação ao grupo FK ($3,2 \pm 0,4$ ng/ml). (Figura 11). Em trabalho de revisão Mignat ⁽⁴⁶⁾ abordou as interações medicamentosas entre o FK 506 e outras drogas, considerando-as em três categorias: drogas que aumentam a disfunção renal com potencialização do efeito; drogas que afetam a concentração sanguínea por interferência na absorção ou no metabolismo do FK 506 (farmacocinética) e, drogas que têm sua farmacocinética afetada pelo FK 506. A interação medicamentosa com os AINHs está citada na primeira categoria e tem sido atribuída às alterações no metabolismo das PGs.^(57,148) Em nosso trabalho ficou evidenciada a potencialização do efeito renal do FK 506 quando associado aos AINHs, pois houve diminuição do RFG, como já abordado anteriormente, porém, ocorreu também alteração na farmacocinética, com diminuição significativa da concentração sanguínea do FK 506 nos grupos com associação de drogas (Figura 11). Na literatura, vários relatos clínicos, estudos em animais ou investigações in vitro, citam diversas drogas que afetam a farmacocinética do FK 506, aumentando ou diminuindo sua concentração sanguínea, entretanto, não existem citações com os AINHs. Algumas drogas que aumentam a concentração sanguínea do FK 506, por inibição do metabolismo:

eritromicina,⁽¹⁴⁹⁾ clotrimazol,⁽¹⁵⁰⁾ fluconazol,⁽¹⁵¹⁾ danazol,⁽¹⁵²⁾ itraconazol, cetoconazol, diltiazem, verapamil e cimetidina.⁽¹⁵³⁾ Outras drogas interferem, acelerando o metabolismo do FK 506 por indução das enzimas do citocromo P 450, diminuindo sua concentração sanguínea: rifampicina,⁽¹⁵⁴⁾ dexametasona, corticosterona, ergotamina, nifedipina, omeprazol.⁽¹⁵⁵⁾ Sheiner⁽⁴⁷⁾ relatou dois casos de pacientes com transplante de fígado, que desenvolveram IRA com o uso concomitante do FK 506 e ibuprofeno. Após a retirada do ibuprofeno houve total recuperação da função renal. Apenas em um paciente foi titulada a CSFK, que permaneceu inalterada durante o período de administração conjunta com o AINH, sugerindo ter ocorrido apenas somação do efeito renal. Em nosso trabalho, de acordo com os dados de literatura, a associação com AINHS potencializou a ação renal do FK 506, com diminuição do RFG, entretanto, não encontramos nos trabalhos publicados pesquisados, nenhuma citação de interferência na farmacocinética. Nossos dados sugerem fortemente que a associação com AINHS provoca também modificações na farmacocinética do FK 506, pois ocorreu significativa queda de sua concentração sanguínea. Uma possível explicação seria que, tanto o FK 506 como os AINHS têm alta afinidade de ligação com as proteínas plasmáticas e, por competição, pode ter ocorrido aumento da fração livre do FK 506, favorecendo seu metabolismo e excreção. Outros estudos experimentais são necessários para comprovar estes dados e elucidar os mecanismos envolvidos.

5. CONCLUSÕES

5. CONCLUSÕES

- A associação do FK 506 com um inibidor não-seletivo da COX causou diminuição mais acentuada na filtração glomerular que a associação com um inibidor seletivo da COX-2.
- A queda da filtração glomerular causada pela associação do FK 506 com os AINHs ocorreu independentemente da diminuição do FSR ou aumento da RVR, estando provavelmente relacionada à diminuição do Kf.
- A tendência à antidiurese foi similar para a associação do FK 506 com antiinflamatório inibidor não-seletivo da COX e inibidor seletivo da COX-2.
- A administração do FK 506 separadamente ou associado com AINHs por curto tempo (7 dias), não provocou alterações histológicas renais significativas.
- A associação do FK 506 com antiinflamatório inibidor não-seletivo da COX causou discreta toxicidade sistêmica, evidenciada pela perda de peso, quando comparada com o inibidor seletivo da COX-2.
- Nos animais tratados com a associação FK 506 e AINHs as concentrações sanguíneas do FK 506 foram significativamente menores do que no grupo com FK 506 isolado, sugerindo alterações na farmacocinética.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kino T, Hatanaka H, Miyata S, Inamura N, Nishiyama M, Yajima T, et al. FK 506, a novel immunosuppressant isolated from a *Streptomyces*. II: immunosuppressive effect of FK 506 in vitro. J Antibiot (Tokyo) 1987; 40(9):1256-65.
2. Schreiber SL, Crabtree GR. The mechanism of action of cyclosporin A and FK 506. Immunol Today 1992;13(4):136-42.
3. Ruzicka T, Assman T, Homey B. Tacrolimus. The drug for the turn of the millennium ? Arch Dermatol 1999;135:574-80.
4. Venkataramanan R, Jain A, Warty VW, Abu-Elmagd K, Furakawa H, Inventarza O, et al. Pharmacokinetics of FK 506 following oral administration : a comparison of FK 506 and cyclosporine. Transplant Proc 1991; 23:931-3.
5. Alaiti S, Kang S, Fiedler VC , Ellis CN, Spurlin DV, Fader D, et al. Tacrolimus(FK 506) ointment for atopic dermatitis – A phase I study in adults and children. J Am Acad Dermatol 1998; 38(1):69-76.
6. Sattler M, Guengerich FP, Yun CH, Christian U, Sewing KF. Cytochrome P-450 3A enzymes are responsible for biotransformation of FK 506 and rapamycin in man and rat. Drug Metab Dispos 1992; 20(5):753-61.

7. Iwasaki K, Shiraga T, Matsuda H, Nagasi K, Tokuma Y, Hata T, et al. Further metabolism of FK 506 (tacrolimus). Identification and biological activities of the metabolites oxidized at multiple sites of Fk 506. *Drug Metab Dispos* 1995; 23(1):28-34.
8. Clipstone NA, Crabtree GR. Identification of calcineurin as a key signalling enzyme in T-lymphocyte activation. *Nature* 1992; 357(6380):695-7.
9. Liu J. FK 506 and cyclosporin, molecular probes for studying intracellular signal transduction. *Immunol today* 1993;14(6):290-5.
10. Rao A. NF-ATp: a transcription factor required for the co-ordinate induction of several cytokine genes. *Immunol Today* 1994; 15:274-81.
11. Morris RE. Mechanism of actions of new immunosuppressive drugs. *Kidney Int Suppl* 1996;49(53):26-38.
12. Ochiai T, Nakajima K, Nagata M, Suzuki T, Asano T, Uematsu T, et al. Effect of a new immunosuppressive agent, FK 506, on heterotopic cardiac allotransplantation in the rat. *Transplant Proc* 1987; 19:1284-6.
13. Starzl T E, Todo S, Fung JJ, Demetris AJ, Venkataramanan R, Jain A. FK 506 for liver, kidney and pâncreas transplantation. *Lancet* 1989; 2(8670):1000-4.
14. Fung JJ, Abu-Elmagd K, Jain A, Gordon R, Tzakis A, Todo S, et al. A randomized trial of primary liver transplantation under immunosuppression with FK 506 vs cyclosporine. *Tranplant Proc* 1991;23 (6):2977-83.

15. Todo S, Fung JJ, Starzl TE, Tzakis A, Demetris AJ, Kormos RL, et al. Liver, kidney and toracic organ transplantation under FK 506. *Ann Surg* 1990;212(3):295-307.
16. Armitage JM, Kormos RL, Morita S, Fung JJ, Marrone GC, Hardesty RL, et al. Clinical trial of FK 506 immunosuppression in adult cadiac transplantation. *Ann Thorac Surg* 1992;54(2):205-11.
17. Mayer AD, Dmitrewski J, Squifflet JP, Besse T, Grabensee B, Klein B, et al. Multicenter randomized trial comparing tacrolimus (FK 506) and cyclosporine in the prevention of renal allograft rejection: a report of the European Multicentre Renal Study Group. *Transplantation* 1997;64(3):436-43.
18. Wiesner RH. A long-term comparison of tracolimus (FK 506) versus cyclosporine in liver transplantation: a report of the United States FK 506 Study Group. *Transplantation* 1998;66(4):493-9.
19. Sola R, Diaz JM, Guirado L, Sainz Z, Gich I, Picazo M, et al. Tacrolimus in induction immunosuppressive treatment in renal transplantation: comparison with cyclosporine. *Transplant Proc* 2003;35(5):1699-700.
20. Jiang H, Sakuma S, Fujii Y, Akiyama Y, Ogawa T, Tamura K, et al. Tacrolimus versus cyclosporin A: a comparative study on rat renal allograft survival. *Transpl Int* 1999;12(2):29-9.
21. Thomson AW, Starzl TE. FK 506 and autoimmune disease: perspective and prospects. *Autoimmunity* 1992;12(4):303-13.

22. Loeffler K, Gowrishankar M, Yiu V. Tacrolimus therapy in pediatric patients with treatment-resistant nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol* 2004;19(3):281-7.
23. Kondo H, Abe T, Hashimoto H, Uchida S, Irimajiri S, Hara M et al. Efficacy and safety of tacrolimus (FK 506) in treatment of rheumatoid arthritis: a randomized, double blind , placebo controlled dose-finding study. *J Rheumatol* 2004;31(2):243-51.
24. The European FK 506 Multicentre Psoriasis Study Group. Systemic tacrolimus (FK 506) is effective for the treatment of psoriasis in a double-blind, placebo controlled study. *Arch Dermatol* 1996;132(4):419-23.
25. Sakane T, Mochizuki M, Inaba G, Masuda K. A phase II study of FK 506 (tacrolimus) on refractory uveitis associated with Behçet's disease and allied condition. *Ryumachi* 1995;35(5):802-13.
26. Koga T, Yano T, Ichikawa Y, Oizumi K, Mochizuki M. Pulmonary infiltrates recovered by FK 506 in a patient with Behçet's disease. *Chest* 1993;104(1):309-11.
27. Evreklioglu C. Managing the symptoms of Behçet disease. *Expert Opin Pharmacother* 2004;5(2):317-28.
28. Abu-Elmagd K, Jegasothy BV, Ackerman CD, Thomson AW, Rilo H, Nikolaidis N, Van Thiel D, Fung JJ, Todo S, Starzl TE. Efficacy of FK 506 in the treatment of recalcitrant pioderma gangrenosum. *Tranplant Proc* 1991;23(6):3328-9.

29. Fung JJ , Alessiani M, Abu-Elmagd K, Todo S, Shapiro R, Tzakis A, et al. Adverse effects associated with the use of FK 506. *Transplant Proc* 1991;23(6):3105-8.
30. Randhawa PS, Shapiro R, Jordan ML, Starzl TE, Demetris AJ. The histopathological changes associated with allograft rejection and drug toxicity in renal transplant recipients maintained on FK 506. Clinical significance and comparison with cyclosporine. *Am J Surg Pathol* 1993; 17(1):60-8.
31. Andoh TF, Burdmann EA, Fransechini N, Houghton DC, Bennett WM. Comparison of acute rapamycin nephrotoxicity with cyclosporine and FK 506. *Kidney Int* 1996;50(4):1110-7.
32. Andoh TF, Burdmann EA, Bennett WM. Nephrotoxicity of immunosuppressive drugs: Experimental and clinical observations. *Semin Nephrol* 1997;17(1):34-45.
33. Stillman IE, Andoh TF, Burdmann EA, Bennett WM, Rosen S. FK 506 nephrotoxicity : morphologic and physiologic characterization of a rat model. *Lab Invest* 1995;73(6):794-803.
34. Andoh TF, Burdmann EA, Lindsey J, Houghton DC, Bennett WM. Functional and structural characteristics of experimental FK 506 nephrotoxicity. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1995; 22(9):646-54.

35. Young EW, Ellis CN, Messana JM, Johnson KJ, Leichtman AB, Mihatsch MJ, et al. A prospective study of renal structure and function in psoriasis patients treated with cyclosporin. *Kidney Int* 1994;46(4):1216-22.
36. Ryffel B, Weber E, Mihatsch MJ. Nephrotoxicity of immunosuppressants in rats: comparison of macrolides with cyclosporin. *Exp Nephrol* 1994;2(6):324-33.
37. Bagnis C, Deray G, Dubois M, Adabra Y, Jacquiaud C, Jaudon MC, et al. Comparative acute nephrotoxicity of FK 506 and cyclosporin an isolated in situ autoperfused rat kidney model. *Am J Nephrol* 1997;17(1):17-24.
38. McCauley J, Studer R, Craven P, Murray S. The effects of cyclosporine A , cyclosporine G and FK 506 upon prostaglandin production in renal mesangial cells in culture. *Transplant Proc* 1991; 23(6):3141-2.
39. Benigni A, Morigi M , Perico N, Zoja C, Amuchastegui CS, Piccinelli A, et al. The acute effect of FK 506 and cyclosporine on endothelial cell function and renal vascular resistance. *Tranplantation* 1992;54(5): 775-80.
40. Su Q, Weber L, LeHir M, Zenke G, Ryffel B. Nephrotoxicity of cyclosporin A and FK 506 : inhibition of calcineurin phosphatase. *Ren Physiol Biochem* 1995;18(3): 128-39.
41. Olyaei AJ, de Mattos AM, Bennett WM. Nephrotoxicity of immunosuppressive drugs: new insight and preventive strategies. *Curr Opin Crit Care* 2001;7(6):384-9.

42. Japanese FK 506 Study Group. Morphological characteristics of renal allografts showing renal dysfunction under FK 506 therapy: is graft biopsy available to reveal the morphological findings corresponding with FK 506 nephropathy? *Transplant Proc* 1993;25(1Pt1):624-7.
43. Myers BD, Sibley R, Newton L, Tomlanovich SJ, Boshkos C, Stinson E, et al. The long-term course of cyclosporine-associated chronic nephropathy. *Kidney Int* 1988;33(2):590-600.
44. Holmer S, Eckardt KU, LeHir M, Schricker K, Riegger G, Kurtz A. Influence of dietary NaCL intake on renin gene expression in the kidneys and adrenal glands of rats. *Pflugers Arch* 1993;425(1-2):62-7.
45. Bennett WM. Drug interactions and consequences of sodium restriction. *Am J Clin Nutr* 1997;65(2Suppl):678-81.
46. Mignat C. Clinically significant drug interactions with new immunosuppressive agents. *Drug Saf* 1997;16(4):267-78.
47. Scheiner PA, Mor E, Chodoff L, Glabman S, Emre S, Schwartz ME, et al. Acute renal failure associated with the use of ibuprofen in two liver transplant recipients on FK 506. *Tranplantation* 1994;57(7):1132-3.
48. Vane JR, Bakhle YS, Botting RM. Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1998;38:97-120.

49. Garavito RM, Dewitt DL. The cyclooxygenase isoforms: Structural insights into the conversion of arachidonic acid to prostaglandins. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1441(2-3):278-87.
50. Smith WL. Prostanoid biosynthesis and mechanism of action. *Am J Physiol* 1992; 263(2Pt2):181-91.
51. Yang T, Singh I, Pham H, Sun D, Smart A, Schnermann JB, et al. Regulation of cyclooxygenase expression in the kidney by dietary salt intake. *Am J Physiol* 1998;274(3Pt2):481-9.
52. Breyer MD, Breyer RM. G protein-coupled prostanoid receptors and the kidney. *Annu Rev Physiol* 2001;63:579-605.
53. Vane JR. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat New Biol* 1971;231(25):232-5.
54. Mitchell JA, Akarasereenont P, Thiemermann C, Flower RJ, Vane JR. Selectivity of nonsteroidal antiinflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90(24):11693-7.
55. McGettigan P, Henry D. Current problems with non-specific COX inhibitors. *Curr Pharm Des* 2000;6(17):1693-724.
56. Delmas PD. Non-steroidal antiinflammatory drugs and renal function. *Br J Rheumatol* 1995;34(suppl 1):25-8.

57. Dunn MJ, Zambraski EJ. Renal effects of drugs that inhibit prostaglandin synthesis. *Kidney Int* 1980;18(5):609-22;
58. Zambraski EJ. The effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on renal function: experimental studies in animals. *Semin Nephrol* 1995;15(3):205-213.
59. Blasingham MC, Nasjletti A. Differential renal effects of cyclooxygenase inhibition in sodium-replete and sodium deprived dog. *Am J Physiol* 1980;239:360-5.
60. De Forrest JM, Davis JO, Freeman RH, Seymour AA, Rowe BP, Williams GM, et al. Effects of indomethacin and meclofenamate on renin release and renal hemodynamic function during chronic sodium depletion in conscious dogs. *Circ Res* 1980; 47(1):99-107.
61. Oliver JA, Sciacca RR, Pinto J, Cannon PJ. Role of the prostaglandin in norepinephrine release during augmented renal sympathetic nerve activity in the dog. *Cir Res* 1981;48(6Pt1):835-43.
62. Palmer BF, Henrich WL. Clinical acute renal failure with nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Semin Nephrol* 1995; 15(3):214-27.
63. Brater DC. Anti-inflammatory agents and renal function. *Semin Arthritis Rheum* 2002;32(3 Suppl 1):33-42.

64. Kleinknecht D, Landais P, Goldfarb B. Analgesic and non-steroidal antiinflammatory drug-associated acute renal failure: a prospective collaborative study. *Clin Nephrol* 1986;25(6):275-81.
65. Masferrer JL, Zweifel BS, Manning PT, Hauser SD, Leahy KM, Smith WG, et al. Selective inhibition of inducible cyclooxygenase-2 in vivo is antiinflammatory and nonulcerogenic. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91(8):3228-32.
66. Schmassmann A, Peskar BM, Slettler C, Netzer P, Stroff T, Flogerzi P, et al. Effects of inhibition of prostaglandin endoperoxide synthase-2 in chronic gastro-intestinal ulcer models in rats. *Br J Pharmacol* 1998;123(5):795-804.
67. Chan CC, Boyce S, Brideau C, Charleson S, Cromlish W, Ethier D, et al. Rofecoxib [Vioxx , M K – 0966; 4-(4'- methylsulfonylphenyl)-3-phenyl-2-(5H)-furanone] : A potent and orally active cyclooxygenase-2 inhibitor. Pharmacological and biochemical profiles. *J Pharmacol Exp Ther* 1999;290(2):551-60.
68. Laine L, Harper S, Simon T, Bath R, Johanson J, Schwartz H, et al. A randomized trial comparing the effect of rofecoxib, a cyclooxygenase 2-specific inhibitor, with that of ibuprofen on the gastroduodenal mucosa of patients with osteoarthritis. Rofecoxib Osteoarthritis Endoscopy Study Group. *Gastroenterology* 1999;177(4):776-83.

69. Kaplan-Machlis B, Klostermeyer BS. The cyclooxygenase-2 inhibitors: safety and effectiveness. *Ann Pharmacother* 1999;33(9):979-88.
70. Harris RC, McKanna JA, Akai Y, Jacobson HR, Dubois RN, Breyer MD. Cyclooxygenase-2 is associated with the macula densa of rat kidney and increases with salt restriction. *J Clin Invest* 1994;94(6):2504-10.
71. Muscara MN, Vergnolle N, Lovren F, Triggle CR, Elliot SN, Asfaha S, et al. Selective cyclo-oxygenase-2 inhibition with celecoxib elevates blood pressure and promotes leucocyte adherence. *Br J Pharmacol* 2000;129(7):1423-30.
72. Komers R, Lindsley JN, Oyama TT, Schutzer WE, Reed JF, Mader SL, et al. Immunohistochemical and functional correlations of renal cyclooxygenase-2 in experimental diabetes. *J Clin Invest* 2001;107(7):889-98.
73. Black SC, Brideau C, Cirino M, Belley M, Bosquet J, Chan CC, et al. Differential effect of selective cyclooxygenase-2 inhibitor versus indomethacin on renal blood flow in conscious volume-depleted dogs. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998;32(5):686-94.
74. Whelton A, Schulman G, Wallemark C, Drower EJ, Isakson PC, Verburg KM, et al. Effects of celecoxib and naproxeno on renal function in the elderly. *Arch Intern Med* 2000;160(10):1465-70.
75. Swan SK, Rudy DW, Lasseter KC, Ryan CF, Buechel KL, Lambrecht LJ, et al. Effect of cyclooxygenase-2 inhibition on renal function in elderly persons

- receiving a low salt diet. A randomized, controlled trial. *Ann Intern Med* 2000;133(1):1-9.
76. Gertz BJ, Krupa D, Bolognese JA, Speiling RS, Reicin A. A comparison of adverse renovascular experiences among osteoarthritis patients treated with rofecoxib and comparator non-selective non-steroidal anti-inflammatory agents. *Curr Med Res Opin* 2002;18(2):82-91.
77. Perazella MA, Eras J. Are selective COX-2 inhibitor nephrotoxic ? *Am J Kidney Dis* 2000; 35(5): 937-40.
78. Sandhu GK, Heyneman CA. Nephrotoxic potential of selective cyclooxygenase-2 inhibitors. *Ann Pharmacother* 2004; 38(4):700-4.
79. Braden GL, O'Shea MH, Mulhern JG, Germain MJ. Acute renal failure and hyperkalaemia associated with cyclooxygenase-2 inhibitors. *Nephrol Dial Transplant* 2004;19(5):1149-53.
80. Reinhold SW, Fischereder M, Riegger GA, Kramer BK. Acute renal failure after administration of a single dose of a highly selective COX-2 inhibitor. *Clin Nephrol* 2003;60(4):295-6.
81. Ahmad SR, Kortepeter C, Brinker A, Chen M, Beitz J. Renal failure associated with the use of celecoxib and rofecoxib. *Drug Saf* 2002;25(7):537-44.

82. Morales E, Mucksavage JJ. Cyclooxygenase-2 inhibitor-associated acute renal failure: case report with rofecoxib and review of the literature. *Pharmacotherapy* 2002;22(10):1317- 21.
83. Papaioannides D, Bouropoulos C, Sivapides D, Korantzopoulos P, Akritidis N. Acute renal dysfunction associated with selective COX-2 inhibitor therapy. *Int Urol Nephrol* 2001;33(4):609-11.
84. Torres-Lopez JE, Lopez-Munoz FJ, Castaneda-Hernandez G, Flores-Murrieta FJ, Granados-Soto V. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of the antinociceptive effect of diclofenac in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 1997;282(2): 685-90.
85. Hadad SJ, Souza ER, Ferreira AT, Ishiro ME, Boim MA, Razvickas CV, et al. FK506 : effects on glomerular hemodynamics and on mesangial cells in culture. *Kidney Int* 1995;48(1):56-64.
86. Wolf G, Neilson EG. Angiotensina II as a hipertrofogenic cytokine for proximal tubular cells. *Kidney Int Suppl* 1993;39:100-7.
87. Textor SC, Wiesner R, Wilson DJ, Porayko M, Romero JC, Burnett JC' Jr, et al. Systemic and renal hemodynamic differences between FK506 and cyclosporine in liver transplant recipients. *Transplantation* 1993;55(6):1332-9.
88. Mitamura T, Yamada A, Ishida H, Fujihira S, Ohara K, Noguchi H, et al. Tacrolimus (FK506)-induced nephrotoxicity in spontaneous hypertensive rats. *J Toxicol Sci* 1994;19(4):219-26.

89. Butani L, Afshinnik A, Johnson J, Javaheri D, Peck S, German JB, et al. Amelioration of tacrolimus-induced nephrotoxicity in rats using juniper oil. *Transplantation* 2003;76(2):306-11.
90. Schermann J, Briggs JP. Participation of renal cortical prostaglandins in the regulation of glomerular filtration rate. *Kidney Int* 1981;19(6):802-15.
91. Sraer J, Siess W, Moulonguet-Doleris L, Oudinet JP, Dray F, Ardaillou R. In vitro prostaglandin synthesis by various rat renal preparations. *Biochim Biophys Acta* 1982;710(1):45-52.
92. Schlondorff D. Renal Prostaglandin synthesis. Sites of production and specific actions of prostaglandins. *Am J Med* 1986;81(2B):1-11.
93. Dunn MJ, Hood VL. Prostaglandins and the kidney. *Am J Physiol* 1997;233(3):169-84.
94. Zambraski EJ, Dunn MJ. Renal prostaglandin E₂ secretion and excretion in conscious dogs. *Am J Physiol* 1979;236(6):552-8.
95. Echtenkamp SF, Davis JO, DeForrest JM, Rowe BP, Freeman RH, Seymour AA, et al. Effects of indomethacin, renal denervation and propranolol on plasma renin activity in conscious dogs with chronic thoracic caval constriction. *Circ Res* 1981;49(2):492-500.
96. Oliver JA, Sciacca RR, Pinto J, Cannon PJ. Role of the prostaglandin in norepinephrine release during augmented renal sympathetic nerve activity in the dog. *Circ Res* 1981;48(6Pt1):835-43.

97. Zambraski EJ, Dunn MJ. Importance of renal prostaglandins in control of renal function after chronic ligation of the common bile duct in dogs. *J Lab Clin Med* 1984;103(4):549-59.
98. O'Neill PA, Wait RB, Kahng KU. Role of renal sympathetic nerve activity in renal failure associated with obstructive jaundice in the rat. *Am J Surg* 1991;161(6):662-7.
99. Cadnapaphornchai P, Aisenbrey G, McDonald KM, Burke TJ, Schrier RW. Prostaglandin-mediated hyperemia and renin-mediated hypertension during acute ureteral obstruction. *Prostaglandins* 1978;16(6):965-71.
100. Stahl RA, Kudelka S, Paravicini M, Schollmeyer P. Prostaglandin and thromboxane formation in glomeruli from rats with reduced renal mass. *Nephron* 1986;42(3):252-7.
101. Dzau VJ, Packer M, Lilly LS, Swartz SL, Hollenberg NK, Williams GH. Prostaglandins in severe congestive heart failure. Relation to activation of the renin-angiotensin system and hyponatremia. *N Engl J Med* 1984;310(6):347-52.
102. Walshe JJ, Venuto RC. Acute oliguric renal failure induced by indomethacin: possible mechanism. *Ann Intern Med* 1979;91(1):47-9.
103. Boyer TD, Zia P, Reynolds TB. Effect of indomethacin and prostaglandin A1 on renal function and plasma renin activity in alcoholic liver disease. *Gastroenterology* 1979;77(2):215-22.

104. Zipser RD, Kerlin P, Hoefs JC, Zia P, Barg A. Renal kallikrein excretion in alcoholic cirrhosis. Relationship to other vasoactive systems. *Am J Gastroenterol* 1981;75(3):183-7.
105. Zipser RD, Hoefs JC, Speckart PF, Zia P, Horton R. Prostaglandins: modulators of renal function and pressor resistance in chronic liver disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1979;48(6):895-900.
106. Brater DC, Anderson SA, Brown-Cartwright D, Todo RD. Effects of nonsteroidal antiinflammatory drugs on renal function in patients with renal insufficiency and in cirrhotics. *Am J Kidney Dis* 1986;8(5):351-5.
107. Arroyo V, Gines P, Rimola A, Gaya J. Renal function abnormalities, prostaglandins, and effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in cirrhosis with ascite. An overview with emphasis on pathogenesis. *Am J Med* 1986;81(Suppl 2 B):104-22.
108. Gentilini P. Cirrhosis, renal function and NSAIDs. *J Hepatol* 1993;19(2):200-3.
109. Arisz L, Donker AJ, Brentjens JR, van der Hem GK. The effect of indomethacin on proteinuria and kidney function in the nephrotic syndrome. *Acta Med Scand* 1976;199(1-2):121-5.
110. Kleinknecht C, Broyer M, Gubler MC, Palcoux JB. Irreversible renal failure after indomethacin in steroid-resistant nephrosis. *N Engl J Med* 1980;302(12):691.

111. Higa EM, Schor N, Boim MA, Ajzen H, Ramos OL. Role of the prostaglandin and Kallikrein-Kinin systems in aminoglycoside-induced acute renal failure. *Braz J Med Biol Res* 1985;18(3):355-65.
112. Humes HD. Aminoglycoside nephrotoxicity. *Kidney Int* 1988;33(4):900-11.
113. Bunke M, Wilder L, Matin A. The effect of cyclosporine on agonist-stimulated glomerular and mesangial cell vasodilatory prostaglandin production. *Transplantation* 1991;52(4):718-22.
114. Spurney RF, Mayros SD, Collins D, Ruiz P, Klotman PE, Coffman T. Thromboxane receptor blockade improves cyclosporine nephrotoxicity in rats. *Prostaglandins* 1990;39(2):135-46.
115. Garella S, Matarese RA. Renal effects of prostaglandins and clinical adverse effects of nonsteroidal anti-inflammatory agents. *Medicine* 1984;63(3):165-81.
116. Whelton A. Nephrotoxicity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs: physiologic foundations and clinical implications. *Am J Med* 1999;106(5B):13-24.
117. Ailabouni W, Eknayan G. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and acute renal failure in the elderly. A risk-benefit assessment. *Drugs Aging* 1996;9(5):341-51.
118. Schlondorff D. Renal complications of nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Kidney Int* 1993;44(3):643-53.

119. Bennett WM. Geriatric pharmacokinetics and the kidney. *Am J Kidney Dis* 1990;16(4):283-8.
120. Needleman P, Isakson PC. The discovery and function of COX-2. *J Rheumatol* 1997;24(Suppl 49):6-8.
121. Kujubu DA, Fletcher BS, Vanum BC, Lim RW, Herschman HR. TIS 10, a phorbol ester tumor promoter-inducible mRNA from Swiss 3T3 cells, encodes a novel prostaglandin synthase/cyclooxygenase homologue. *J Biol Chem* 1991;266(20):12866-72.
122. Xie WQ, Rothblum LI. Rapid, small-scale RNA isolation from tissue culture cells. *Biotechniques* 1991;11(3):324,326-7.
123. Warner TD, Giuliano F, Vojnovic I, Bukasa A, Mitchell JA, Vane JR. Nonsteroid drug selectivities for cyclo-oxygenase-1 rather than cyclo-oxygenase-2 are associated with human gastrointestinal toxicity: a full in vitro analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96(13):7563-8. Erratum in: *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96(17):9666.
124. Meade EA, Smith WL, DeWitt DL. Differential inhibition of prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase) isozymes by aspirin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Biol Chem* 1993;268(9):6610-4.
125. Van Hecken A, Schwartz JI, Depre M, De Lepeleine I, Dallob A, Tanaka W, et al. Comparative inhibitory activity of rofecoxib, meloxicam, diclofenac, ibuprofen and naproxen on COX-2 versus COX-1 in healthy volunteers. *J Clin Pharmacol* 2000;40(10):1109-20.

126. Silverstein FE, Faich G, Goldstein JL, Simon LS, Pincus T, Whelton A, et al. Gastrointestinal toxicity with celecoxib vs. nonsteroidal anti-inflammatory drugs for osteoarthritis and rheumatoid arthritis: The CLASS study: A randomized controlled trial. Celecoxib Long-Term Arthritis Safety Study. *JAMA* 2000;284(10):1247-55.
127. Bombardier C, Laine L, Reicin A, Shapiro D, Burgos-Vargas R, Davis B, et al. VIGOR Study Group. Comparison of upper gastrointestinal toxicity of rofecoxib and naproxen in patients with rheumatoid arthritis. VIGOR Study Group. *N Engl J Med* 2000;343(21):1520-8.
128. Rossat J, Maillard M, Nussberger J, Brunner HR, Burnier M. Renal effects of selective cyclooxygenase-2 inhibition in normotensive salt-depleted subjects. *Clin Pharmacol Ther* 1999;66(1):76-84.
129. Perazella MA, Tray K. Selective cyclooxygenase-2 inhibitors: a pattern of nephrotoxicity similar to traditional nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Am J Med* 2001;111(1):64-7.
130. Whelton A. COX-2 specific inhibitors and the kidney: effect on hypertension and oedema. *J Hypertens* 2002;20(Suppl 6):31-5.
131. Gambaro G, Perazella MA. Adverse renal effects of anti-inflammatory agents: evaluation of selective and nonselective cyclooxygenase inhibitors. *J Intern Med* 2003;253(6):643-52.

132. Kramer BK, Kammerl MC, Komhoff M. Renal cyclooxygenase-2(COX-2). Physiological, pathophysiological, and clinical implications. *Kidney Bood Press Res* 2004;27(1):43-62.
133. Khan KN, Venturini CM, Bunch RT, Brassard JA, Koki AT, Morris DL, et al. Interspecies differences in renal localization of cyclooxygenase isoforms: implications in nonsteroidal antiinflammatory drug-related nephrotoxicity. *Toxicol Pathol* 1998;26(5):612-20.
134. Scharschmidt LA, Simonson M, Dunn MJ. Glomerular prostaglandins, angiotensin II and nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Am J Med* 1986;81(Suppl 2B):30-42.
135. Uchida K, Ballermann BJ. Sustained activation of PGE₂ synthesis in mesangial cells cocultured with glomerualr endothelial cells. *Am J Physiol* 1992;263(1Pt1):200-9.
136. Schlondorff D, Rocznik S, Satriano JA, Folkert VW. Prostaglandin synthesis by isolated rat glomeruli : effect of angiotensin II. *Am J Physiol* 1980; 239(5):486-95.
137. Schlondorff D, Aynedjian HS, Satriano JA, Bank N. In vivo demonstration of glomerular PGE₂ responses to physiological manipulations and experimental agents. *Am J Physiol* 1987;252(4Pt2):717-23.
138. Rodriguez F, Llinas MT, Gonzalez JD, Rivera J, Salazar FJ. Renal changes induced by a cyclooxygenase-2 inhibitor during normal and low sodium intake. *Hypertension* 2000;36(2):276-81.

139. Komers R, Anderson S, Epstein M. Renal and cardiovascular effects of selective cyclooxygenase-2 inhibitors. *Am J Kidney Dis* 2001;38(6):1145-57.
140. Harris RC Jr. Cyclooxygenase-2 inhibition and renal physiology. *Am J Cardiol* 2002;89(6A):10-7.
141. Gross JM, Dwyer JE, Knox FG. Natriuretic response to increased pressure is preserved with COX-2 inhibitors. *Hypertension* 1999;34(5):1163-7.
142. Catella-Lawson F, McAdam B, Morrison BW, Kapoor S, Kujubu D, Antes L, et al. Effects of specific inhibition of cyclooxygenase-2 on sodium-balance, hemodynamics and vasoactive eicosanoids. *J Pharmacol Exp Ther* 1999;289(2):735-41.
143. Whelton A, Maurath CJ, Verburg KM, Geis GS. Renal safety and tolerability of celecoxib, a novel cyclooxygenase-2 inhibitor. *Am J Ther* 2000;7(3):159-75
144. Finn WF. FK 506 nephrotoxicity. *Ren Fail* 1999;21(3-4):319-29.
145. Gaber LW, Moore LW, Reed L, Russell W, Alloway R, Hathaway D, et al. Renal histology with varying FK 506 blood levels. *Transplant Proc* 1997;29(1-2):186.
146. Andoh TF, Burdmann EA, Lidsley J, Houghton DC, Bennett WM. Enhancement of FK506 nephrotoxicity by sodium depletion in an experimental rat model. *Transplantation* 1994;57(4):483-9.

147. Sanders LR. Exercise-induced acute renal failure associated with ibuprofen, hydrochlorothiazide and triamterene. *J Am Nephrol* 1995;5(12):2020-3.
148. Peters DH, Fitton A, Plosker GL, Faulds D. Tacrolimus. A review of its pharmacology and therapeutic potential in hepatic and renal transplantation. *Drugs* 1993;46(4):746-94.
149. Jensen C, Jordan M, Shapiro R, Scantlebury V, Hakala T, Fung JJ, et al. Interaction between tacrolimus and erythromycin. *Lancet* 1994;344(8925):825.
150. Mieles L, Venkataramanan R, Yokoyama I, Warty VJ, Starzl TE. Interaction between FK 506 and clotrimazole in a liver transplant recipient. *Transplantation* 1991;52(6):1086-7.
151. Manez R, Martin M, Raman D, Silverman D, Jain A, Warty VS, et al. Fluconazole therapy in transplant recipients receiving FK 506. *Transplantation* 1994;57(10):1521-3.
152. Shapiro R, Venkataramanan R, Warty VS, Scantlebury VP, Rybka W, McCauley J, et al. FK 506 interaction with danazol. *Lancet* 1993;341(8856):1344-5.
153. Venkataramanan R, Swaminathan A, Prasad T, Jain A, Zucherman S, Warty VS, et al. Clinical pharmacokinetics of tacrolimus. *Clin Pharmacokinet* 1995;29(6):404-30.

154. Furlan V, Perello L, Jacquemin E, Debray D, Taburet AM. Interactions between FK 506 and rifampicin or erythromycin in pediatric liver recipients. *Transplantation* 1995;59(8):1217-8.
155. Christian U, Schmidt G, Bader A, Lampen A, Schottmann R, Linck A, et al. Identification of drugs inhibiting the in vitro metabolism of tacrolimus by human liver microsomes. *Br J Clin Pharmacol* 1996;41(3):187-90.