

El óxido nítrico en la nefrotoxicidad experimental por Ciclosporina A*

► Lilia Cristina De la Cruz Rodríguez¹, Sara Emilia Posleman², Carmen Rosa Araujo³, María Rosario Rey⁴

1. Doctora en Bioquímica. Profesora Titular Bioquímica Clínica III.
2. Bioquímica y Farmacéutica. Profesora Asociada Bioquímica Clínica III.
3. Bioquímica. Profesora Adjunta Bioquímica Clínica III.
4. Bioquímica. Jefe de Trabajos Prácticos Histología Normal y Elementos de Histopatología.

* Instituto de Bioquímica Aplicada. Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia. Universidad Nacional de Tucumán. Balcarce 747. 4000 San Miguel de Tucumán. Argentina. Tel.: 54-381- 431-0994.

Resumen

La nefrotoxicidad aguda por Ciclosporina A (CyA) está caracterizada por la disminución del flujo plasmático renal. El óxido nítrico (NO), factor de vasodilatación, pareciera explicar la nefrotoxicidad por CyA. En este trabajo se estudia al NO inducido por L-Arginina (L- Arg) y su efecto en la nefrotoxicidad experimental por CyA. Se trabajó con ratas machos (Wistar) que fueron divididas en 4 grupos de 8 animales cada uno (n = 8): A, B, C y D. Los grupos A y B fueron alimentados con dietas estándares, los grupos C y D se suplementaron con 500 mg/kg de alimento de L-Arg. Los grupos B y D fueron tratados con 0,1 mL de CyA de una solución de 50 mg/mL durante 7 días. Se evaluó filtración glomerular determinando creatinina sérica y *clearance* de creatinina. Se investigó el NO por eliminación de sus metabolitos urinarios: nitritos + nitratos en orina de 24 h. La creatinina sérica del Grupo D, tratado con L-Arg y CyA, fue significativamente mayor respecto a los otros Grupos ($p \leq 0,05$). El *clearance* de creatinina decreció significativamente en los grupos tratados con CyA (B y D). Los valores hallados de nitritos + nitratos urinarios fueron significativamente mayores en los Grupos C y D tratados con L-Arg ($p \leq 0,05$), no encontrándose diferencias significativas de B respecto a A. En los grupos C y D se observó aumento de tamaño de los riñones de ratas; los cortes histológicos de los mismos estudiados con la técnica de Hematoxilina-Eosina mostraron un parénquima renal hipotrófico con franca vasodilatación de los túbulos de la zona medular y cortical y descamación celular con núcleos en la luz tubular renal. Se concluye que, si bien la CyA provoca un efecto vasoconstrictor de la arteriola aferente, con disminución en la perfusión cortical y medular, el aumento en la producción de NO utilizando como precursor la L-Arg, provoca vasodilatación, a la vez que induce a un daño renal severo que se potencia con la presencia de CyA que aumentaría la producción de Óxido Nítrico Sintetasa (NOS) vía iNOS mRNA.

Palabras clave: nefrotoxicidad * ciclosporina A * óxido nítrico.

Summary

THE NITRIC OXIDE IN EXPERIMENTAL NEPHROTOXICITY INDUCED BY CYCLOSPORINE A

The acute nephrotoxicity induced by cyclosporine A (CyA) is characterized by a renal plasmatic flux decrease. The nitric oxide (NO), which is a vasodilating factor, seems to be the explanation for nephrotoxicity by CyA. The aim

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957

of this work is to evaluate the effect of NO induced by L- Arginine (L- Arg) in experimental nephrotoxicity by CyA. The studied population consisted on male rats divided into 4 groups (n = 8): A, B, C and D. Groups A and B were treated with standard diet, and groups C and D were supplemented by 500 mg/kg of food of L-Arg. Groups B and D were treated with 0,1 ml of 50 mg/ml of CyA solution during 7 days. The glomerular filtration was evaluated through serum creatinine and creatinine clearance. The serum creatinine of group D, treated with L-Arg and CyA, was significantly greater than in the other groups ($p \leq 0.05$). The creatinine clearance decreased in groups B and D (treated with CyA). NO was investigated by the excretion of urinary metabolites : nitrite + nitrate in 24 h urinary samples. The oxide nitric values were significantly greater in groups C and D, treated with L-Arg ($p \leq 0.05$), but there were no significant differences of B in relation to A. Anatomo-histological changes were evaluated. There was an increase kidney's size. Hipotrophic renal parenchima and renal-tubule dilatation with cellular descamation were observed with histological methods. Therefore: If CyA has a vasoconstrictor effect on the afferent arteriole together with a decrease in the medular and cortical perfusion, the increase in the production of NO provokes vasodilatation and induces to a severe renal injure which makes itself more powerful in the presence of CyA that would increase the production of Nitric Oxide Sintetase (NOS) via iNOS mRNA.

Key words: *nephrotoxicity * cyclosporine A * nitric oxide.*

Introducción

La Ciclosporina A (CyA), una potente droga inmunosupresora usada en transplante de órganos y tejidos, plantea un riesgo potencial de nefrotoxicidad (1-5).

La nefrotoxicidad aguda por CyA está caracterizada por disminución del flujo plasmático renal que produce una disminución del índice de filtración glomerular, fenómeno reversible por supresión de la droga (6-8).

El preciso mecanismo de la nefrotoxicidad por CyA no está claramente entendido, pero ha sido atribuido a la vasoconstricción de la arteriola aferente (5-8).

El balance entre vasoconstricción y vasodilatación regula el flujo plasmático y la presión de perfusión del riñón (6). Endotelina, angiotensina II y tromboxano A₂ han sido implicados como factores responsables de la vasoconstricción (7-9). Por otro lado, el óxido nítrico (NO) ha sido reconocido como un factor de vasodilatación (8-16).

El efecto vasoconstrictor de la CyA resultaría de la pérdida del balance entre los factores vasoactivos y vasodilatadores (17).

El estudio del sistema modulador "metabolismo renal del NO", podría aportar una aproximación lógica para entender la nefrotoxicidad por CyA (12-16).

Según algunos autores (18-22), dietas suplementadas con L-Arginina (L-Arg), aminoácido precursor del NO, favorecen la vasodilatación, atenuando el efecto nefrotóxico de CyA en ratas.

En el presente trabajo se ha estudiado la acción del NO en la nefrotoxicidad aguda experimental inducida en ratas con CyA. El incremento de la producción de NO se hizo por administración de L-Arg, previo a la

acción de CyA. Se estudiaron los cambios bioquímicos e histológicos producidos a nivel renal.

Materiales y Métodos

ANIMALES Y DROGAS

Los experimentos fueron realizados en ratas machos adultos Wistar de 200 a 260 g de peso corporal, hospedadas en jaulas estándares en un ambiente de 12 h de luz a 20 °C y un porcentaje de humedad del 60%. Fueron alimentadas con dieta estándar para roedores y agua corriente como bebida, bajo estricto cumplimiento de las Normas Internacionales de Buenas Prácticas de Manufactura (GMP) y de laboratorio (GLP). La CyA fue provista por Laboratorios Sandoz (Germany). Fue diluida en aceite de oliva a una concentración final de 50 mg/mL; de esta solución se administró oralmente una dosis de 0,1 mL, lo que equivale a 25 mg/kg de peso corporal/día. Las dosis empleadas de CyA son equivalentes a las usadas en pacientes antes de ser transplantados (período de inducción), las que pueden ser aún más elevadas en situación de crisis de rechazo. Se seleccionaron estas dosis con el objetivo de inducir nefrotoxicidad aguda en un período de siete días. L-Arginine (Sigma Chemical Co, St. Louis, M.O.) fue agregada al alimento balanceado en una concentración de 500 mg/kg de alimento; la cantidad promedio diaria consumida por animal es de 20 g de alimento balanceado.

Aceite de oliva y otras drogas utilizadas fueron de Sigma Chemical Co.

PROTOCOLO

Los animales fueron divididos al azar en cuatro grupos de 8 (ocho) cada uno ($n = 8$).

Los grupos fueron tratados durante 4 semanas de la siguiente manera:

Grupos A y B, alimentados con dieta estándar para roedores.

Grupos C y D, alimentados con dieta estándar para roedores suplementada con L-Arg.

Los cuatro grupos recibieron esta alimentación durante 4 (cuatro) semanas. A la quinta semana y durante 7 (siete) días, los grupos B y D recibieron por vía oral CyA.

MUESTRAS DE SANGRE Y ORINA

Al comienzo y al final del tratamiento con CyA se recogieron muestras de sangre de la vena de la cola y por punción intracardiaca respectivamente, sin anticoagulante para obtener suero y determinar creatinina.

Muestras de orina de 24 horas fueron recogidas hospedando los animales en jaulas metabólicas individuales. Las mismas fueron usadas para determinar el *clearance* de creatinina y nitritos + nitratos.

MÉTODOS

La creatinina sérica y urinaria fue determinada por el método de Jaffé modificado (Wiener Lab). Los resultados se expresan en mg/dL.

La excreción urinaria de nitritos + nitratos se ha determinado según Bartolomew (23) con los reactivos de Griess usando nitrato reductasa (Sigma) y NADPH (Sigma) como cofactor. Los resultados se expresan en $\mu\text{M}/24 \text{ h}$. Se calculó el *clearance* de creatinina con datos obtenidos en suero y orina. Según fórmula, los resultados se expresan en mL/min.

Creatinina en orina mg/dL x Volumen de orina en mL/min

Creatinina en suero mg/dL

ESTUDIO HISTOLÓGICO

Los animales fueron sacrificados por decapitación, los riñones fueron extraídos y colocados inmediatamente en fijador (formaldehído al 10%). Se incluyeron los órganos en Paraplas, resina sintética y finalmente, se practicaron cortes de tejido de 4 a 5 micras de espesor.

La observación microscópica se realizó con la coloración morfológica de Hematoxilina-Eosina.

ESTUDIO ESTADÍSTICO

Los resultados se expresaron como Media \pm Desviación estándar de la Media. La significancia estadística de los diferentes valores para los parámetros individuales en los 4 grupos experimentales fue determinada por el *test* de Student. El grado de significancia fue definido como $p \leq 0,05$.

Resultados

Los resultados expresados en la Tabla I muestran que la administración de CyA en las dosis dadas, durante 7 días en el grupo B provoca una falla renal aguda. Esto se traduce en un aumento significativo de creatinina sérica, como así también en una disminución del índice de filtración glomerular, expresada en la disminución del *clearance* de creatinina ($p \leq 0,05$) en el grupo B respecto del grupo A.

Los nitritos + nitratos urinarios del grupo B no mostraron diferencias con respecto al grupo A.

Las ratas alimentadas con dietas suplementadas con L-Arg, (grupos C y D), muestran un marcado incremento de los nitritos + nitratos urinarios ($p \leq 0,05$), con respecto a A y B. Los nitritos + nitratos en plasma no se consignan, ya que la L- Arg y el S- Nitrosothiol actúan como interferentes de la reacción de Griess

Tabla I. Comparación de Medias de los grupos con o sin Ciclosporina A y con o sin L- Arginina.

Grupos	Diferencia de peso corporal	Creatinina sérica mg/dL	Clearance de creatinina mL/min	Nitritos+ Nitratos $\mu\text{M}/24\text{h}$
A Control (n = 8)	43,6 \pm 3,2	0,55 \pm 0,08	0,61 \pm 0,08	11,1 \pm 1,5
B Con CyA (n = 8)	35,8 \pm 2,8 d	0,92 \pm 0,15 a	0,31 \pm 0,06 a	12,2 \pm 1,8 d
C Con Arg (n = 8)	38,5 \pm 2,5 d	0,70 \pm 0,06 a,b	0,42 \pm 0,06 a,b	23,5 \pm 2,0 a,b
D Con Arg+CyA (n = 8)	17,9 \pm 1,9 a,b,c	1,21 \pm 0,17 a,b,c	0,19 \pm 0,04 a,b,c	24,2 \pm 2,2 a,b

a, $p \leq 0,05$ vs grupo A. b, $p \leq 0,05$ vs grupos B. c, $p \leq 0,05$ vs grupo C. d = NS

(24). La creatinina sérica y el *clearance* de creatinina mostraron para el grupo C diferencias significativas respecto de los grupos A y B ($p \leq 0,05$).

El grupo D tratado simultáneamente durante 7 días con L-Arg y CyA mostró un deterioro marcado de la funcionalidad renal expresado por el incremento de creatinina sérica y la disminución significativa del *clearance* de creatinina respecto de los grupos A, B y C ($p < 0,05$).

Las diferencias de los pesos corporales durante el ensayo no mostraron significancia (NS) para los grupos B y C respecto del grupo A. Sólo el grupo D exhibió una disminución significativa del peso corporal respecto de los grupos A, B y C.

ESTUDIO MORFOLÓGICO DEL RIÑÓN

La Figura 1 es la imagen microscópica del parénquima renal normal (grupo A).

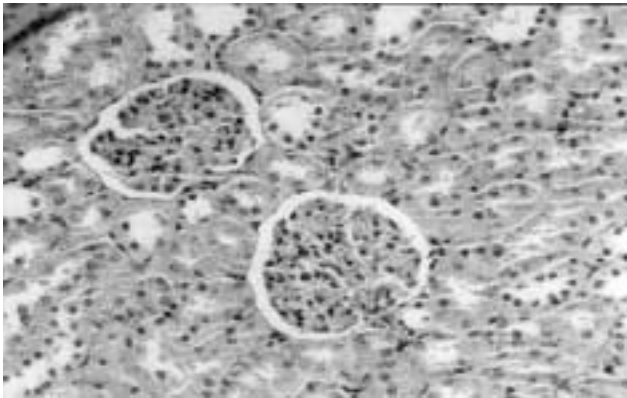


Figura 1. Observación microscópica de riñón de rata normal (grupo A). Se observa parénquima renal conservado.

Los riñones de ratas alimentadas con dieta suplementada con L-Arg + CyA (grupo D) mostraron macroscópicamente aumento de tamaño. Los cortes transversales de estos riñones mostraron órganos ahuecados y totalmente atrofiados (Fig. 2).

Microscópicamente se observó hipotrofia del parénquima renal tanto en la zona cortical como en la medular. Se encontraron focos de dilatación vascular con acidofilia de las células tubulares y disminución de la cantidad de tejido funcional (Fig. 3).

La Figura 4 muestra un corte longitudinal de túbulos de la zona medular del grupo C tratado exclusivamente con L-Arg, observándose dilatación con presencia de células descamadas y núcleos en la luz tubular.

La Figura 5 muestra un corte transversal de médula renal, grupo C con observación de túbulos, en su mayoría dilatados.

No existen diferencias estructurales en los cortes histológicos del grupo C y D, observándose en ambos casos hipotrofia generalizada del parénquima renal.

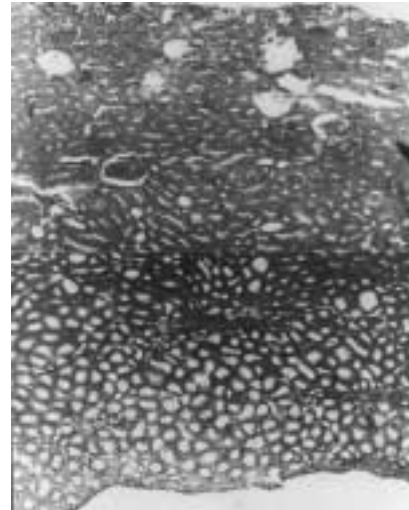


Figura 2. Observación microscópica de corte transversal de riñón de rata tratado con CyA y L-Arg (grupo D). Se observa hipotrofia del tejido funcional, ahuecado en el centro del órgano. (Aumento 20x)



Figura 3. Riñón de rata tratado con CyA + L-Arg (grupo D). Se observa atrofia del órgano al microscopio óptico: hipotrofia del parénquima renal, tanto en zona cortical como medular. Disminución de tejido funcional, con marcada vasodilatación de los túbulos medulares. (Aumento 20x)

Discusión

En la última década, diferentes autores han intentado explicar los mecanismos de nefrotoxicidad por CyA (1-4). La mayoría atribuyeron su efecto tóxico a cambios hemodinámicos, entre ellos vasoconstricción de la arteriola aferente, con disminución de la perfusión renal y de la filtración glomerular (1-8).

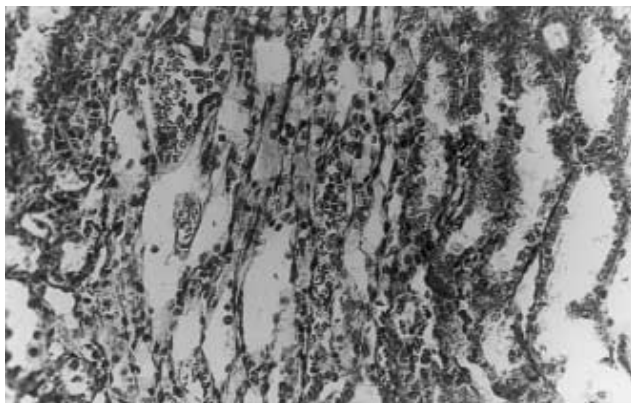


Figura 4. Médula de riñón de rata con L-Arg (grupo C): corte longitudinal de túbulo. Al microscopio óptico se observa dilatación, células descamadas y núcleos en la luz de los túbulo. (Aumento 40x)

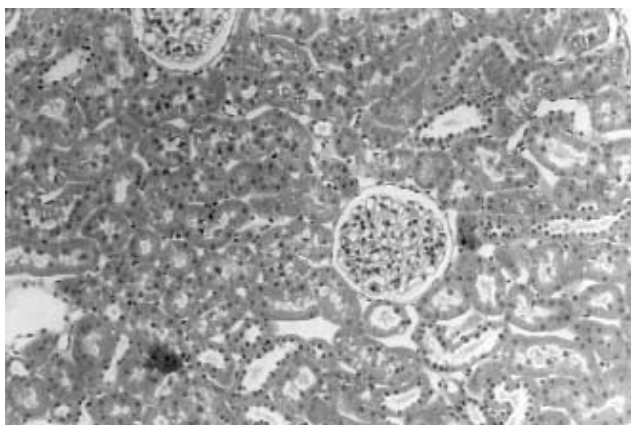


Figura 5. Médula de riñón de rata con L-Arg (grupo C): corte transversal. Se observan los túbulo en su mayoría dilatados. (Aumento 40x)

El efecto vasoconstrictor de la CyA resulta de la pérdida del balance entre factores vasoactivos y vasodilatadores. La modulación del metabolismo renal del NO parece ser una lógica aproximación para entender la nefrotoxicidad por CyA (8-17).

Recientes estudios han sugerido que la N-nitro L-arginine methyl ester (L-NAME), inhibidor competitivo de la óxido nítrico sintetasa (NOS) actúa como vasoconstrictor disminuyendo la hemodinamia renal (14) (16) (18-21) y la suplementación con L-Arg, precursor del NO, atenúa la disfunción renal inducida por CyA (18-22). Otros autores realizaron la misma experiencia en nefrotoxicidad por gentamicina, llegando a idénticas conclusiones (21).

Sin embargo, los resultados obtenidos por los autores en ratas alimentadas con suplemento de L-Arg (Grupo C) durante 4 semanas mostraron franca vasodilatación de los túbulo de la zona medular y cortical y a la vez, hipotrofia generalizada sobre el tejido renal con descamación celular y núcleos en la luz tubular

renal. Idénticos cambios fueron observados en el grupo de ratas tratadas con CyA + L-Arg, (Grupo D) dejando claramente establecido que sin bien la L-Arg contrarrestó la vasoconstricción resultó por sí sola nefrotóxica por ser precursor del NO.

Por ello, estos resultados se contraponen a aquellos reportados por otros autores que atribuyen el efecto nefrotóxico de CyA a la baja producción de NO. Asimismo, queda establecido que la suplementación de L-Arg como precursor de NO, no mejora el efecto de CyA (25) (26). A su vez, dichos resultados serían coincidentes con los obtenidos por otros autores (14), los que reportaron un incremento de la actividad de óxido nítrico sintetasa (NOS) en respuesta a CyA trabajando en cultivos de diferentes líneas celulares y observaron que ningún inhibidor modifica el incremento de iNOS mRNA, expresión elucidada por CyA. Ellos concluyen que CyA induce apoptosis en células renales medida por la inducción de iNOS vía p53, contribuyendo este efecto a la fibrosis característica de la nefrotoxicidad por CyA (27).

Conclusiones

Si bien la CyA provoca un efecto vasoconstrictor de la arteriola aferente, con disminución de la perfusión cortical y medular, el aumento en la producción de NO utilizando como precursor la L-Arg, provoca vasodilatación, a la vez que induce a un daño renal severo que se potencia con la presencia de CyA que aumentaría la producción de óxido nítrico sintetasa (NOS) vía iNOS mRNA.

Con estos resultados queda claramente establecido que si bien el inmunosupresor CyA provoca un efecto vasoconstrictor de la arteriola aferente, con disminución de la perfusión cortical y medular que lleva a la hipoxia del tejido renal, no sería el efecto primero de la nefrotoxicidad por CyA y que habría otros mecanismos a nivel celular responsables de la misma.

Estos resultados se correlacionarían con trabajos previos de los autores donde se demostró el efecto perturbador de especies reactivas del oxígeno sobre las membranas celulares (28) (29).

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido subsidiado por el Consejo de Ciencia y Técnica de Tucumán, Secretaría de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional de Tucumán y Fundación Wiener Lab.

CORRESPONDENCIA

DRA. LILIA CRISTINA DE LA CRUZ RODRÍGUEZ
DE DANTUR
Diagonal 9 n° 1025, B° Padilla
4000 SAN MIGUEL DE TUCUMÁN. ARGENTINA
Tel. 54-381-434-5233
E-mail: dantur@arnet.com.ar

Referencias bibliográficas

1. Bennett, WM. *The nephrotoxicity of immunosuppressive drugs*. Clin Nephrol 1995; 43: suppl: 3-7.
2. Myers BD. *Cyclosporine associated chronic nephrotoxicity*. N Engl J Med 1984; 311: 699-705.
3. Mason J. *Renal side-effects of cyclosporin A*. Br J Dermatol 1990; 36 (Suppl): 71-7.
4. Van Buren DH, Burke YF, Lewis R. *Renal function in patients receiving long-term cyclosporine therapy*. J Am Soc Nephrol 1994; 4: 517-22.
5. Myers BD, Sibley L, Newton L, Tomlanovich SJ, Boshkos C, Stinson E, et al. *The long-term course of cyclosporine – associated chronic nephropathy*. Kidney Int 1988, 33: 590-600.
6. Baylis C, Harton P, Engels K. *Endothelial derived relaxing factor controls renal hemodynamic in the normal rat kidney*. J Am Soc Nephrol 1990; 1: 875-81.
7. Kon V, Sugiura M, Inagami T, Harrie BR, Ichikawa I, Hoover RL. *Role of endothelin in cyclosporine-induced glomerular dysfunction*. Kidney Int 1990; 37: 1487-91.
8. Gossmann J, Radounikli A, Bernemann A, Schellinski O, Raab HP, BickebAaller R, et al. *Pathophysiology of cyclosporine-induced nephrotoxicity in humans: a role for nitric oxide?* Kidney Blood Press Res 2001; 24 (2): 111-5.
9. Lancaster JR. *Simulation of the diffusion and reaction of endogenously produced nitric oxide*. Proc Natl Acad Sci USA 1994; 91: 8137-41.
10. Klaritonov VG, Sundquist AR., Sharma VS: *Kinetics of nitrosation of thiol by nitric oxide in the presence of oxygen*. J Biol Chem 1995; 270: 28158-64.
11. Wink DA, Nim RW, Darhyshire JF, Christodoulou D, Haubauer I, Cox GW, et al. *Reaction kinetic for nitration of cysteine and glutathione in aerobic nitric oxide solutions at neutral pH: Insights into the fate and physiological effects of intermediates generated in the NO/O₂ reaction*. Chem Res Toxicol 1994; 7: 519-25.
12. Jover B, Mimran A. *Nitric oxide inhibition and renal alterations*. J Cardiovasc Pharmacol 2001; 38 Suppl 2: S65-70.
13. Dobashi K, Asayama K, Nakane T, Hayashibe H, Nakazawa S. *Induction of glutathione peroxidase in response to inactivation by nitric oxide*. Free Radic Res 2001; 35 (3): 319-27.
14. Amore A, Emancipator SN, Cirina P, Conti G, Ricotti E, Bagheri N, et al. *Nitric oxide mediates cyclosporine-induced apoptosis in cultured renal cells*. Kidney Int 2000; 57 (4): 1549-59.
15. Yokozawa T, Chung HY, Kim DW, Goto H. *Involvement of superoxide and/or nitric oxide in renal tissue injury* Exp Toxicol Pathol 1999; 51 (6): 517-21.
16. Bobadilla NA, Gamba G, Tapia E, García-Torres R, Bolio A, Lapez-Zetina P, et al. *Role of NO in cyclosporin nephrotoxicity: effects of chronic NO inhibition and NO synthase gene expression*. Am J Physiol 1998; 274 (4Pt2): 791-8.
17. Perico N, Benigni A, Bosco E, Rossini M, Orisio S, Ghilardi F, et al. *Acute cyclosporine A nephrotoxicity in rats: Which role for renin-angiotensin system and glomerular prostaglandins?* Clin Nephrol 1989; 25 (suppl 1): 83-8.
18. Lahera V, Salom MG, Miranda-Guardiola F, Moncada S, Romero JC. *Effects of N_G-nitro-L-arginine-methyl ester on renal function and blood pressure*. Am J Physiol 1991; 261: F 1033 - F1037.
19. De Nicola L, Thomson SC, Wead LM, Brown MR, Gabbai FB. *Arginine feeding modifies cyclosporine nephrotoxicity in rats*. J Clin Invest 1993; 92: 1892-9.
20. Chul Woo Y, Yong Soo K, Jun K, Young OK, So Youn M, Euy Jin Ch, et al. *Oral supplementation of L-Arginine prevents chronic cyclosporine nephrotoxicity in rats*. Exp Nephrol 1998; 6: 50-6.
21. Rivas Cabanero L, Rodríguez Barbero A, Arévalo M, Lopez Novoa JM. *Effect of NG-nitro L-arginine methyl ester on nephrotoxicity induced by gentamicin in rats*. Nephron 1995; 71 (2): 203-7.
22. Tanaka T, Nakanishi T, Hasuike Y, Inoue T, Noguchi K, Takamitsu Y. *Paradoxical effect of L-arginine on nitric oxide (NO) synthesis and histopathological changes in 5/6 nephrectomized SD rats*. Nippon Jinzo Gakkai Shi 1999; 41 (8): 754-63.
23. Bartholomew B. *A rapid method for the assay of nitrate in urine using the nitrate reductase enzyme of Escherichia coli*-Chem Toxicol 1984; 22: 541-3.
24. Miranda KM, Espey MG, Wink DA. *A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite*. Nitric Oxide 2001; 5 (1): 62-71.
25. Mansour M, Daba MH, Gado A, Al-Rikabi A, Al Majed A. *Protective effect of L-Arginine against nephrotoxicity induced by cyclosporine in normal rats*. Pharmacol Res 2002; 45 (6):441-6.
26. Gordge MP. *How cytotoxic is nitric oxide?* Exp Nephrol 1998; 6: 12-6.
27. Lima R, Serona AP, Schor N, Hgia EM. *Effect of cyclosporin A on nitric oxide production in cultured LLCPK1 cells*. Ren Fail 2001 Jan; 23 (1): 43-52.
28. De la Cruz Rodríguez LC, Del Sanzio EE., Posleman SE. *Antioxidantes enzimáticos en pacientes tratados con gentamicina*. Nefrología Latinoamericana 1997; 4 (5): 270-4.
29. De la Cruz Rodríguez LC, Farías RN, Massa EM. *Damage of Escherichia coli cells by t-butylhydroperoxide involves the respiratory chain but is independent of the presence of oxygen*. Biochimica et Biophysica Acta 1990; 1015: 510-6.

Aceptado para su publicación el 28 de diciembre de 2004