

EFEITO DO 5-MONONITRATO DE ISOSSORBIDO NO CONTEÚDO PLASMÁTICO E PLAQUETAR DE CATECOLAMINAS EM RATOS COM HIPERTENSÃO ARTERIAL INDUZIDA PELA CICLOSPORINA A

Luís Rocha¹, Flávio Reis¹, Luísa Ponte¹, Teresa Alcobia¹, Luís Almeida¹,
José Santos-Dias², José Mesquita², Frederico Teixeira¹

RESUMO

O aumento da reactividade vascular associado à hipertensão arterial induzida pela ciclosporina A (CsA) poderá resultar tanto de um aumento da vasoconstricção como de uma diminuição da vasodilatação. A administração de dadores orgânicos de NO poderá produzir efeitos benéficos pela reposição do sistema NO-GMPc, mas existe o risco de agravamento do sistema nervoso simpático resultante de contra-regulação neuro-hormonal.

Pretendeu-se com este trabalho estudar o efeito da administração, concomitante com a CsA, de um dador orgânico de NO (o 5-Mononitrato de Isossorbido – IS-5-MN) na hipertensão arterial e nos conteúdos plasmáticos e plaquetares de catecolaminas (noradrenalina, adrenalina e dopamina) em ratos tratados com CsA.

Foram testados 5 grupos de ratos administrados diariamente com as seguintes dietas orais: sumo de laranja (grupo controlo) por 7 semanas; 5 mg/kg/dia de CsA (grupo CsA) por 7 semanas; 150 mg/kg/dia (bid) de IS-5-MN (grupo IS-5-MN) por 7 semanas; IS-5-MN durante 2 semanas e IS-5-MN+CsA durante mais 7 semanas (grupo IS-5-MN+CsA); 5 mg/kg/dia de CsA durante 7 semanas e CsA+IS-5-MN por mais 5 semanas (grupo CsA+IS-5-MN).

O tratamento de 7 semanas com CsA originou um aumento das pressões arteriais sistólica e diastólica relativamente ao grupo controlo. Este efeito foi prevenido pelo tratamento prévio com IS-5-MN, mas não foi revertido através de tratamento com o mesmo fármaco após o estabelecimento da HTA pela CsA. Os conteúdos de catecolaminas no plasma foram ligeiramente superiores no grupo CsA versus grupo controlo, especialmente significativo ao nível da dopamina. No

¹ Unidade de Terapêutica do Instituto de Farmacologia e Terapêutica Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra e Instituto de Climatologia e Hidrologia da Universidade de Coimbra;

² Laboratório de Microscopia Electrónica do Departamento de Botânica da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra

Capsulas contendo 25 mg de mesoglicano sódico. O principal ativo do PRISMA[®] Mesoglicano sódico, é uma mistura de glicosaminoglicanos nas seguintes proporções: sulfato de heparano - 47,5%; sulfato de dermatano - 35,5%; sulfato de condroitina - 8,5%; e sulfato de ácido hialurônico de baixo peso molecular - 8,5%.

FORMA FARMACÊUTICA E APRESENTAÇÃO:

Embalagens de 20 e 60 cápsulas doseadas a 25 mg de mesoglicano sódico, para administração oral.

PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS:

Devido, principalmente, à presença de Sulfato de heparano e de sulfato de dermatano, constituintes fundamentais da parede vascular das veias humanas, PRISMA[®] atua a nível endotelial e subendotelial com diversos efeitos farmacológicos: ação antiaterogénica, inibindo a proliferação das células musculares lisas para a camada íntima; estimulando a enzima (protease das lipoproteínas e inibindo a adesão plaquetária; ação antitrombótica, ao activar o protrombina III e cofactor heparínico II; ação fibrinolítica, estimulando a actividade fisiológica do activador tecidual do plasminogénio; restabelece as propriedades de "barreira selectiva" do endotélio vascular; observa-se ainda uma eficaz actividade anti-edematosa ao nível do sistema venoso.

NOME E SEDE DO RESPONSÁVEL PELA AUTORIZAÇÃO DE INTRODUÇÃO NO MERCADO:

LABORATÓRIO MEDINFAR - PRODUTOS FARMACÊUTICOS, S.A., Rua Manuel Ribello Pavia, 1 - 1.ª Venda Nova - 2700 AMADORA.

INDICAÇÕES TERAPÊUTICAS:

PRISMA[®] está indicado nas seguintes situações: vasculopatas secundárias a processos ateroscleróticos localizados quer na circulação cerebral e consequente doença vascular cerebral, quer na circulação periférica (a nível arterial e venoso); nomeadamente nos hipertensos obstrutivos dos membros inferiores; patologia hiperlipidémica, principalmente nos casos de estados hipertriglicéidémicos; estados tromboembólicos.

CONTRA-INDICAÇÕES:

Diátese hemorrágica, estados de hipercoagulabilidade, estados de hipocoagulabilidade.

tratamento com IS-5-MN+CsA os níveis de todas as catecolaminas foram superiores relativamente ao grupo CsA, contrariamente ao grupo CsA+IS-5-MN cujos valores foram idênticos aos do grupo CsA. Inversamente ao plasma, o grupo tratado com IS-5-MN+CsA impediu o aumento nos conteúdos plaquetares de catecolaminas que se verificou no grupo CsA versus o controlo.

Em conclusão, o tratamento preventivo com IS-5-MN, apesar de aumentar os níveis de catecolaminas no plasma, previne o desenvolvimento de HTA produzido pela CsA. Contrariamente, a administração de IS-5-MN após a CsA não altera significativamente os conteúdos em catecolaminas, mas não reverte a hipertensão arterial.

ABSTRACT

Increased vascular reactivity associated with CsA-induced arterial hypertension might result from either an increased vasoconstriction or a decreased vasodilatation. Organic nitric oxide donor administration could have beneficial effects by the NO-cGMP system reposition, but there is the risk of sympathetic nervous system worsening as a result of neuro-hormonal counter-regulation.

This work intended to study the effect of concomitant administration with the CsA of a organic NO donor (the Isosorbide 5-Mononitrate - IS-5-MN) on the arterial hypertension and on the plasma and platelet catecholamines contents (noradrenaline, adrenaline and dopamine) in CsA-treated rats.

Five rat groups daily administered with the following oral diets were tested: orange juice (control group) during 7 weeks; 5 mg/kg/day of CsA (CsA group) during 7 weeks; 150 mg/kg/day (bid) of IS-5-MN (IS-5-MN group) during 7 weeks; IS-5-MN during 2 weeks and IS-5-MN+CsA during additional 7 weeks (IS-5-MN+CsA group); 5 mg/kg/day of CsA during 7 weeks and CsA+IS-5-MN for additional 5 weeks (CsA+IS-5-MN group).

Seven weeks CsA treatment promoted a systolic and a diastolic blood pressure increase when compared with the control. This effect was prevented by previous treatment with IS-5-MN, but was not reverted by the same treatment after the CsA-induced arterial hypertension establishment. Plasma catecholamines contents were slightly higher in the CsA group versus the control, particularly significant for dopamine. In the IS-5-MN+CsA treatment the level of all the catecholamines were higher when compared with the CsA group, against the CsA+IS-5-MN group whose values were identical to the CsA group. Contrarily to the plasma, the IS-5-MN+CsA group has blocked the platelet catecholamines contents enhancement occurred in the CsA group versus the control one.

In conclusion, preventive IS-5-MN treatment, despite increase plasma catecholamines levels, prevents CsA-induced hypertension development. Contrarily, IS-5-MN administration after CsA does not changes significantly the catecholamines contents, but does not reverts the arterial hypertension.

INTRODUÇÃO

A utilização terapêutica da ciclosporina A (CsA), como potente e seletivo imunossupressor, para prevenir a rejeição de órgãos em doentes transplantados, tem estado associada ao desenvolvimento de alguns efeitos secundários graves, nomeadamente nefrotoxicidade, hipertensão arterial (HTA) e aumento do risco de tromboembolismo (1-3). Os mecanismos fisiopatológicos pelos quais a CsA induz hipertensão arterial não estão ainda esclarecidos, mas um aumento da reactividade vascular e plaquetar é um dado adquirido (4,5).

Vários distúrbios fisiológicos poderão estar na base do aumento da vasoconstricção associada à HTA induzida pela CsA (6-9). Os estudos por nós realizados num modelo animal experimental de HTA induzida pela CsA demonstraram alterações nos conteúdos plasmáticos e plaquetares de catecolaminas (CAs), sugerindo o envolvimento do sistema nervoso simpático (SNS) (10).

Para além do aumento da vasoconstricção, o aumento da reactividade poderá resultar de uma diminuição da vasodilatação e/ou de indução de lesão endotelial, como alguns estudos têm sugerido (11-13). O monóxido de azoto (NO) modula a actividade vascular e plaquetar, e distúrbios no sistema NO-GMPc (guanosina 3',5'-monofosfato cíclico) estão associados a variados estados fisiopatológicos do foro cardiovascular (14,15), tal como também é sugerido para a HTA induzida pela CsA (16,17). Contudo, as manipulações farmacoterapêuticas que têm sido investigadas para corrigir aquelas alterações têm-se centrado na administração de L-arginina (o substrato da monóxido de azoto sintetase - NOS), sendo os

resultados obtidos relativamente à reversão das alterações vasculares e da HTA contraditórios (18-20).

Dada o efeito conhecido produzido pelos nitratos orgânicos ao nível da actividade do sistema nervoso simpático resultantes de uma contra-regulação neuro-hormonal em resposta à administração prolongada do vasodilatador (21,22), não poderá ser minimizado o estudo de hipotéticas alterações dos conteúdos de catecolaminas circulantes quando está em causa a possibilidade de prevenção da HTA induzida pela CsA pela administração de nitratos orgânicos.

Assim, com o presente trabalho pretendeu-se estudar o efeito da administração concomitante com a CsA de um fármaco dador de NO, o nitrato orgânico 5-Mononitrato de Isossorbido (IS-5-MN), no desenvolvimento de HTA e nos conteúdos plasmáticos e plaquetares de noradrenalina (NA), adrenalina (AD) e dopamina (DA) como indicadores indirectos da actividade do SNS.

MATERIAIS E MÉTODOS

1 – Os grupos de ratos em estudo e respectivas dietas

Neste estudo foram utilizados ratos Wistar machos de 3 meses de idade e um peso médio de aproximadamente 300 gramas adquiridos ao biotério Charles-River (Barcelona, Espanha). Durante o estudo os ratos foram mantidos em gaiolas apropriadas, numa sala com ar climatizado (~20 °C) e humidade controlada (60%), e sujeitos a ciclos de luz/escuro de ± 12/12 horas. A alimentação consistiu numa dieta sintética apropriada (IPM-R20,

Letica, Espanha) e água *ad libitum*. Os estudos animais foram realizadas em concordância com as Convenções Europeias de manuseamento de animais em investigação.

Os ratos foram divididos em 5 grupos e submetidos diariamente às seguintes dietas orais: Grupo 1 – um grupo de 8 ratos aos quais foi administrado sumo de laranja (grupo controlo) durante 7 semanas; Grupo 2 – um grupo de 8 ratos aos quais foram administrados 5 mg/kg/dia de ciclosporina A (Sandimmune Neoral®, Novartis, Lisboa, Portugal), diluída em sumo de laranja, durante 7 semanas; Grupo 3 – um grupo de 4 ratos aos quais foram administrados 2x/dia 150 mg/kg/dia de ISMN (Monopront®, Ferraz Lynce S.A., Portugal) durante 7 semanas; Grupo 4 – um grupo de 8 ratos aos quais foram administrados 2x/dia 150 mg/kg/dia de ISMN durante as 2 primeiras semanas e ISMN+CsA (5 mg/kg/dia) durante mais 7 semanas; Grupo 5 – um grupo de 8 ratos aos quais foi administrado 5 mg/kg/dia de CsA durante as primeiras 7 semanas e CsA+ISMN (2x/dia; 150 mg/kg/dia) por mais 5 semanas.

As administrações orais de CsA e/ou de sumo de laranja foram feitas com o auxílio de uma cânula esofágica, sempre entre as 17 e as 18 horas. A administração bidiária assimétrica de ISMN efectuou-se entre as 10 e as 11 horas e entre as 17 e as 18 horas de cada dia.

2 – Avaliação das pressões arteriais

Foi avaliada a pressão arterial sistólica (PAS) e a diastólica (PAD) nos 5 grupos de ratos em estudos, a diferentes períodos do tratamento. A medição destes parâmetros foi efectuada na cauda do rato (“tail cuff”), recor-

rendo a um esfigmomanómetro (LE 5001) e a uma gaiola de contenção adequados, provenientes da Letica (Espanha).

3 – Concentração plasmática e plaquetar de catecolaminas

3.1 – Colheita de sangue e preparação das amostras

O sangue foi obtido da veia jugular direita dos ratos, previamente anestesiados por injeção intraperitoneal de 2 ml/kg de uma solução 2:1 (v:v) de 50 mg/ml de cetamina (Ketalar®, Park-Davis) em clorpromazina a 2,5% (Largactil®, Rhône-Poulenc), por intermédio de seringas com ACD (0,1 ml/ml sangue) contendo: ácido cítrico (71 mM), citrato de sódio (85 mM) e D-glicose (111 mM). Transferidas para tubos de polipropileno, as amostras foram então centrifugadas (160 g, 10 min, 10°C) com o objectivo de separar inicialmente o PRP. Separaram-se 100 µl de amostra para contagem das plaquetas e o restante foi submetido a centrifugação a 900 g durante 10 min para obtenção do “pellet” de plaquetas e do PPP. As plaquetas foram ressuspensas numa solução tampão contendo 145 mM de NaCl, 5 mM de KCl, 1 mM de MgSO₄, 1 mM de CaCl₂ e 10 mM de Glicose (pH 7,4).

3.2 – Extração das catecolaminas plasmáticas e plaquetares

As catecolaminas presentes no plasma e nas plaquetas foram depois extraídas da suspensão de plaquetas e do PPP recorrendo ao método de adsorção à alumina (23). Previamente à

sua extração, adicionaram-se 25 µl de um padrão interno (o dihidroxiben-zilamina - DHBA) de concentração conhecida (100 ng/ml), 50 mg de alumina e 1 ml de uma solução Tris-base de pH 8,6. As amostras foram depois mecanicamente (KL2, Tubin-gen, Alemanha) agitadas a 450 rpm (10 minutos, à temperatura ambiente). Após sedimentação da alumina, as amostras foram aspiradas com um sis-tema de vácuo e lavadas 3 vezes com água tridestilada. A alumina foi se-guidamente transferida para um mi-crossistema de filtração com filtros de nylon apropriados (Spin x-HPLC - Ø 22 µm, Costar Corp., Cambridge, EUA), e as catecolaminas extraídas com 200 µl de HClO₄ (0,1 M). Parale-lamente, foi preparada uma amostra padrão contendo igual quantidade de DHBA e padrões de noradrenalina, adrenalina e dopamina (75, 50 e 25 ng/ml, respectivamente) (Sigma Che-micals Co., St. Louis, EUA). A utili-zação de um padrão interno de DHBA permite corrigir erros na quantificação dos reais conteúdos das aminas nas amostras, resultantes do processo de separação cromatográfica.

3.3 – *Quantificação da concentra-ção plasmática e plaquetar de catecolaminas*

Para a quantificação das catecola-minas plasmáticas e plaquetares utili-zou-se um sistema HPLC-ECD (Gilson Applied Chromatographic System, Middleton, EUA) contendo bomba, sistema de injeção automáti-co com “loop” de 50 µl, detector elec-troquímico provido de um eléctrodo de trabalho de carbono vítrio e um eléctrodo de referência Ag/AgCl, a um potencial de 650 mV. Foi utilizada

uma coluna de fase reversa C18 Bio-phase ODS (Bioanalytical Systems Inc., West Lafayette, EUA) de 250 mm de comprimento e 4,6 mm de di-âmetro interno, com 5 µm de diâmetro das partículas. A fase móvel era cons-tituída por uma solução tampão (pH 3,7) de acetato de sódio (0,1 M) e de ácido cítrico (0,1 M), contendo 10% (v/v) de metanol, SDS (0,5 mM), EDTA dissódico (0,15 mM) e dibuti-lamina (1mM). Previamente à sua uti-lização, a fase móvel foi filtrada atra-vés de filtros de HPLC (Ø 0,2 µm/50 mm, Schleicher e Schuell, Dassel, Alemanha) num sistema de vácuo, sob agitação, e o fluxo de perfusão foi ajustado a 1 ml/min. O registo dos cromatogramas foi feito através de software apropriado (“Gilson 710”).

As concentrações de noradrenali-na, adrenalina e dopamina nas amos-tras foram calculadas a partir dos res-pectivos padrões, tendo como refe-rência o padrão interno de DHBA, adicionado paralelamente nas amos-tras e no padrão. Os valores foram ex-pressos em pg/10⁹plaquetas/ml e em ng/ml para as amostras de plaquetas e plasma, respectivamente.

4 – Reagentes

Os solventes utilizados para a quantificação cromatográfica das ca-tecolaminas possuem um alto grau de pureza, tal como requerido para a aná-lise cromatográfica (Lichrosolv da Merck, Darsmstadt, Alemanha), en-quanto que para a preparação das amostras é requerido um grau de pu-reza analítico (proanálise da Merck, Darsmstadt, Alemanha). A água utili-zada para estes estudos foi tridestila-da, sendo a última destilação feita na presença de permanganato de potássio

(4 g/l). As soluções padrão de nora-drenalina, adrenalina, dopamina e de DHBA foram preparadas em ácido perclórico (0,1 M) e mantidas a 4 °C. Estes e os restantes reagentes foram obtidos na Sigma Chemicals Co. (St. Louis, E.U.A.).

5 – Tratamento estatístico

Os resultados são expressos em média aritmética complementada com o intervalo de variação de valores, em erro padrão da média (e.p.m.). A avaliação de diferenças entre duas médias foi efectuada recorrendo ao test de Fisher PLSD através da análise da variância de uma via (ANOVA). Foi definido um valor mínimo de significância estatística correspondente ao nível de probabilidade inferior a 0,05 ($P < 0,05$).

RESULTADOS

1 – Avaliação das pressões arteriais

Foi avaliada a pressão arterial sistólica e a diastólica nos 5 grupos de ratos em estudos, a diferentes períodos do tratamento: na semana 0 num grupo de

30 ratos escolhidos aleatoriamente entre todos os grupos, para servir como controlo antes do início dos tratamentos; na semana 7 para os grupos controlo e CsA; na semana 2 para o grupo IS-5-MN; na semana 9 para o grupo IS-5-MN+CsA; na semanas 12 para o grupo CsA+IS-5-MN.

Verificou-se um aumento significativo das pressões arteriais sistólica e diastólica no grupo tratado com CsA relativamente ao grupo controlo após 7 semanas de tratamento (PAS: CsA - 141 ± 2 mmHg, $P < 0,01$; Controlo - 127 ± 2 mmHg; PAD: CsA - 115 ± 3 mmHg, $P < 0,01$; Controlo - 102 ± 2 mmHg) (Tabela I). Nos ratos tratados durante duas semanas com IS-5-MN e posteriormente com IS-5-MN e CsA por mais 7 semanas, não se verificou qualquer alteração significativa das pressões arteriais (sistólica e diastólica), nem durante as primeiras duas semanas (PAS: 116 ± 2 mmHg; PAD: 108 ± 1 mmHg), nem após 7 semanas de tratamento concomitante com CsA (PAS: 115 ± 3 mmHg; PAD: 96 ± 1) (Tabela 1). Contrariamente, no grupo CsA+IS-5-MN, os valores de PAS e PAD foram ainda superiores (PAS: 160 ± 5 mmHg, $P < 0,001$; PAD: 129 ± 4 , $P < 0,01$) ao do grupo que tomou CsA isoladamente.

TABELA I

Pressões arteriais sistólica e diastólica nos ratos dos grupos controlo, CsA, IS-5-MN+CsA, CsA+IS-5-MN e IS-5-MN

Grupo	Pressão Arterial Sistólica	Pressão Arterial Diastólica
Semana 0	121 ± 1	95 ± 1
Controlo	127 ± 2	102 ± 2
CsA	$141 \pm 2^{**}$	$115 \pm 3^{**}$
IS-5-MN + CsA	$115 \pm 3^{###}$	$96 \pm 1^{###}$
CsA + IS-5-MN	$160 \pm 5^{###}$	$129 \pm 4^{##}$
IS-5-MN	116 ± 2	108 ± 1

Os valores representam médias \pm e.p.m. As diferenças estatisticamente significativas estão expressas através dos símbolos (** = $P < 0,01$; vs o grupo controlo; ## = $P < 0,01$; ### = $P < 0,001$; vs o grupo tratado com CsA)

2 – Concentração plasmática de catecolaminas

A concentração de catecolaminas no plasma foi medida nos 5 grupos de ratos em estudo no fim do respectivo tratamento, isto é: nos grupos controlo, CsA e IS-5-MN, à semana 7; no grupo tratado com IS-5-MN+CsA à semana 9 (2 semanas de IS-5-MN + 7 semanas de IS-5-MN+CsA) e no grupo tratado com CsA+IS-5-MN à semana 12 (7 semanas de CsA + 5 semanas de CsA+IS-5-MN).

As concentrações plasmáticas de NA ($1,659 \pm 0,150$ ng/ml), AD ($0,494 \pm 0,043$ ng/ml) e DA ($0,106 \pm 0,025$ ng/ml) no grupo CsA ainda que mais elevadas, não foram estatisticamente superiores, às obtidas no grupo controlo (NA: $1,326 \pm 0,198$ ng/ml; AD: $0,369 \pm 0,044$ ng/ml; DA: não detectada) (Fig. 1A, 1B e 1C). No grupo tratado com IS-5-MN previamente à administração conjunta com CsA (grupo IS-5-MN+CsA), as concentrações das 3 catecolaminas no plasma (NA: $2,277 \pm 0,449$ ng/ml, $P=0,08$; AD: $0,566 \pm 0,089$ ng/ml; DA: $0,249 \pm 0,078$ ng/ml, $P<0,05$) foram superiores às do grupo tratado só com CsA. No grupo tratado inicialmente com CsA e depois paralelamente com IS-5-MN (grupo CsA+IS-5-MN) os conteúdos das catecolaminas (NA: $1,590 \pm 0,186$ ng/ml, $P=0,07$; AD: $0,364 \pm 0,067$ ng/ml, $P<0,05$; DA: $0,074 \pm 0,015$ ng/ml, $P<0,05$) foram estatisticamente inferiores aos do grupo IS-5-MN+CsA, e muito idênticos aos valores obtidos no grupo CsA (Fig. 1A, 1B e 1C). Nos ratos administrados somente com IS-5-MN os níveis de AD ($0,588 \pm 0,092$ ng/ml, $P<0,05$) e DA ($0,354 \pm 0,153$ ng/ml; $P<0,01$) no plasma foram estatisticamente superiores ao grupo CsA+IS-5-

MN e semelhantes aos encontrados no grupo tratado com IS-5-MN+CsA.

3 – Concentração plaquetar de catecolaminas

A concentração de catecolaminas nas plaquetas foi medida nos 5 grupos de ratos em estudo no fim do respectivo tratamento, tal como anteriormente mencionado para as catecolaminas no plasma.

As concentrações plaquetares de NA ($2,686 \pm 0,320$ pg/ 10^9 plaq./ml, $P<0,05$) e de DA ($0,398 \pm 0,073$ pg/ 10^9 plaq./ml, $P<0,001$), mas não a de AD ($0,980 \pm 0,125$ pg/ 10^9 plaq./ml), no grupo CsA foram estatisticamente superiores às obtidas no grupo controlo (NA: $1,270 \pm 0,274$ pg/ 10^9 plaq./ml; DA: não detectada; AD: $1,106 \pm 0,085$ pg/ 10^9 plaq./ml;) (Fig. 2A, 2B e 2C). No grupo tratado com IS-5-MN previamente à administração conjunta com CsA (grupo IS-5-MN+CsA), as concentrações das 3 catecolaminas nas plaquetas (NA: $1,138 \pm 0,168$ pg/ 10^9 plaq./ml, $P<0,01$; AD: $0,570 \pm 0,143$ pg/ 10^9 plaq./ml, $P=0,06$; DA: $0,212 \pm 0,044$ pg/ 10^9 plaq./ml, $P<0,05$) foram estatisticamente inferiores às do grupo tratado só com CsA. No grupo tratado inicialmente com CsA e depois paralelamente com IS-5-MN (grupo CsA+IS-5-MN) o conteúdo de NA ($3,863 \pm 0,620$ pg/ 10^9 plaq./ml, $P<0,05$) foi superior, o de AD ($0,842 \pm 0,117$ ng/ml) idêntico e o de DA ($0,184 \pm 0,041$ pg/ 10^9 plaq./ml, $P<0,01$) inferior aos obtidos no grupo tratado somente com CsA, (Fig. 2A, 2B e 2C). Nos ratos administrados somente com IS-5-MN os níveis de NA ($0,528 \pm 0,082$ pg/ 10^9 plaq./ml, $P<0,01$), de AD ($0,357 \pm 0,159$ pg/ 10^9 plaq./ml; $P<0,05$) e de DA ($0,298 \pm 0,046$ pg/ 10^9 plaq./ml) nas plaquetas foram inferiores ao grupo CsA.

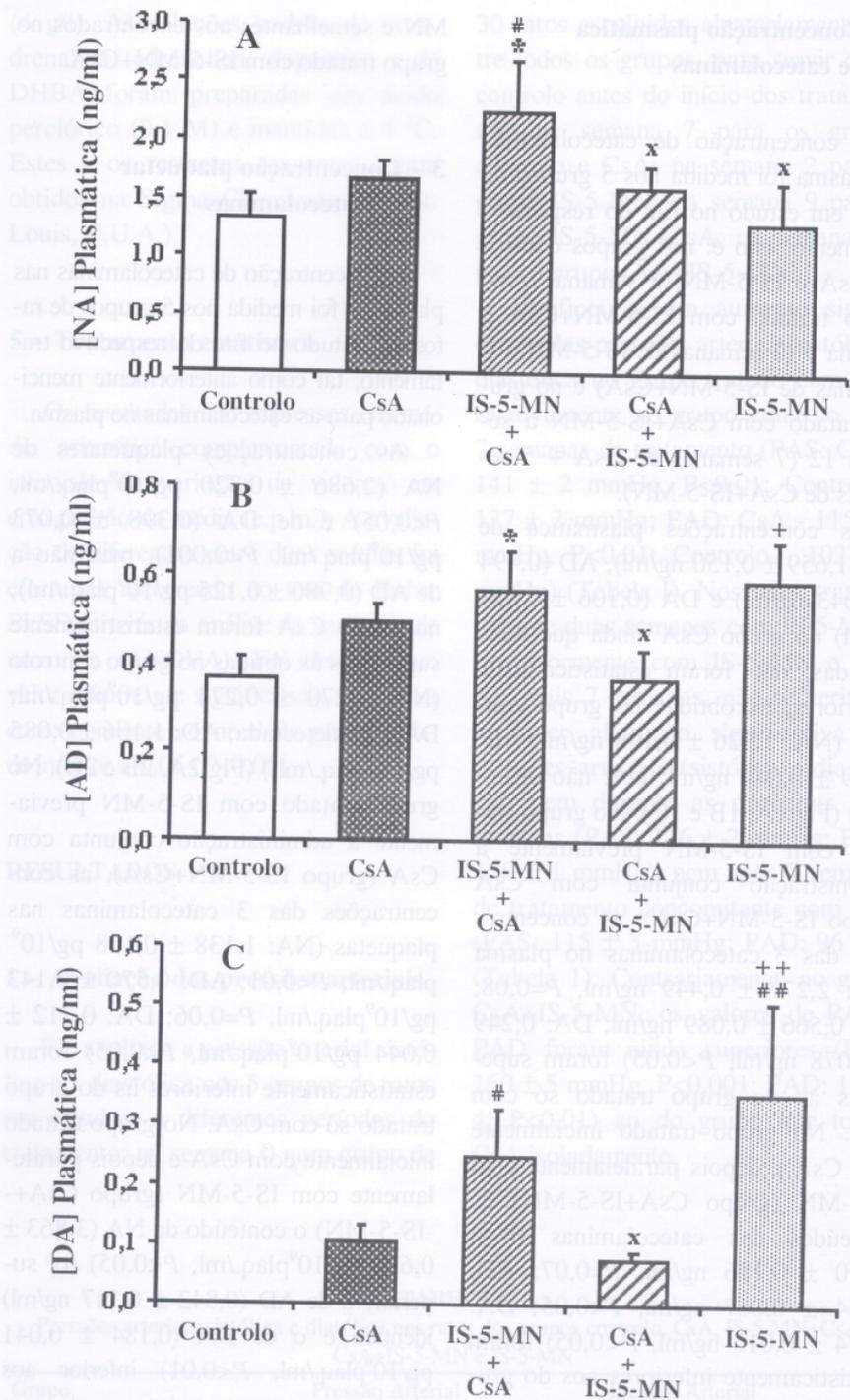


Fig. 1 - Concentração plasmática de noradrenalina (A), adrenalina (B) e dopamina (C) nos ratos dos grupos controlo, CsA, IS-5-MN+CsA, CsA+IS-5-MN e IS-5-MN, após os correspondentes períodos de tratamento. Os valores representam médias \pm e.p.m. As diferenças estatisticamente significativas estão expressas através dos símbolos (* = $P < 0,05$; vs o grupo controlo; # = $P < 0,05$; vs o grupo tratado com CsA; x = $P < 0,05$; vs o grupo IS-5-MN+CsA; + = $P < 0,05$; ++ = $P < 0,01$; vs o grupo CsA+IS-5-MN)

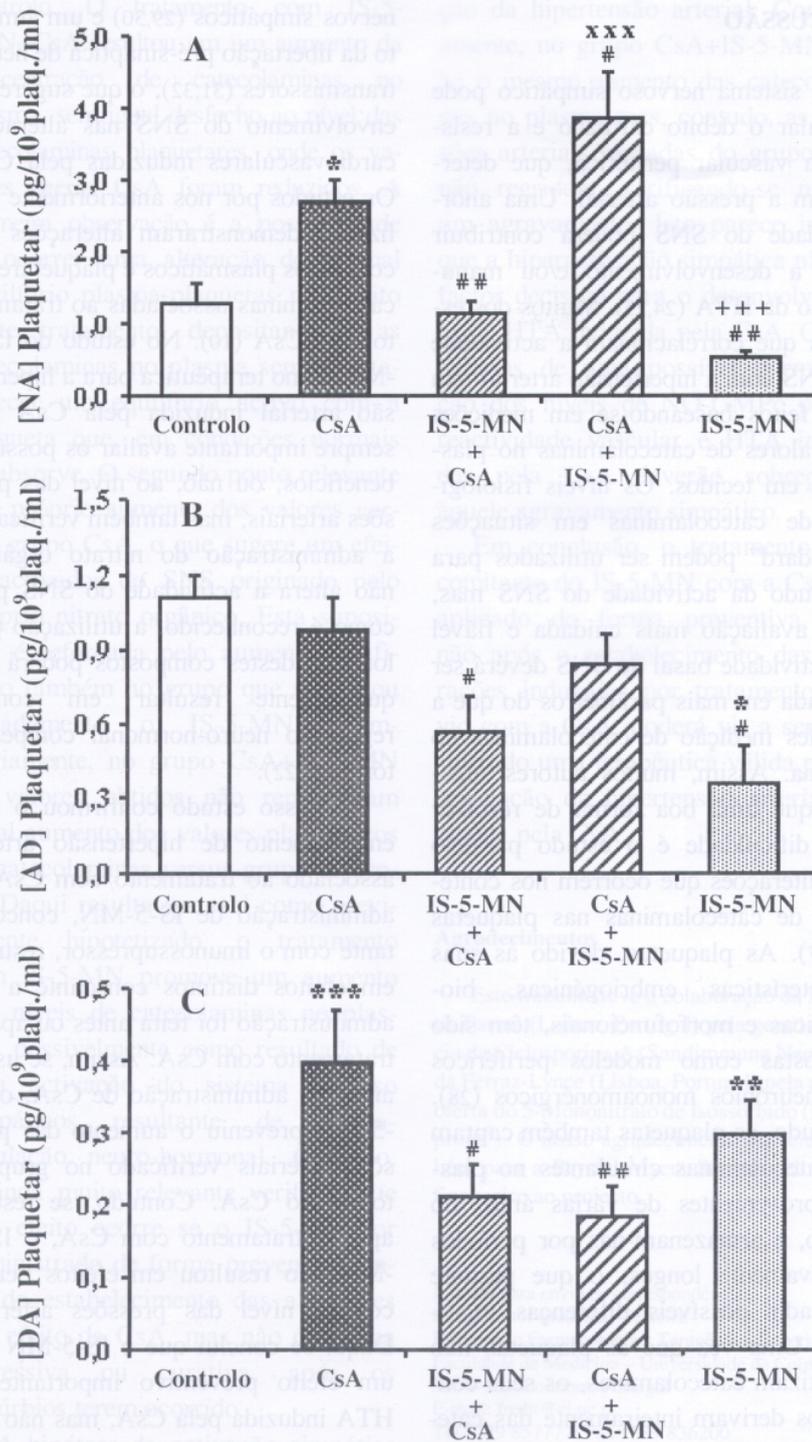


Fig. 2 - Concentração plaquetar de noradrenalina (A), adrenalina (B) e dopamina (C) nos ratos dos grupos controlo, CsA, IS-5-MN+CsA, CsA+IS-5-MN e IS-5-MN, após os correspondentes períodos de tratamento. Os valores representam médias \pm e.p.m. As diferenças estatisticamente significativas estão expressas através dos símbolos (* = P<0,05; ** = P<0,01; *** = P<0,001; vs o grupo controlo; # = P<0,05; ## = P<0,01; vs o grupo tratado com CsA; xxx = P<0,001; vs o grupo IS-5-MN+CsA; +++ = P<0,001; vs o grupo CsA+IS-5-MN)

DISCUSSÃO

O sistema nervoso simpático pode modular o débito cardíaco e a resistência vascular periférica, que determinam a pressão arterial. Uma anormalidade do SNS poderá contribuir para o desenvolvimento e/ou manutenção da HTA (24,25). Muitos dos estudos que correlacionam a actividade do SNS com a hipertensão arterial têm sido feitos baseando-se em medições em valores de catecolaminas no plasma e em tecidos. Os níveis fisiológicos de catecolaminas em situações "standard" podem ser utilizados para o estudo da actividade do SNS mas, uma avaliação mais cuidada e fiável da actividade basal do SNS deverá ser baseada em mais parâmetros do que a simples medição de catecolaminas no plasma. Assim, muitos autores sugerem que uma boa forma de resolver esta dificuldade é o estudo paralelo das alterações que ocorrem nos conteúdos de catecolaminas nas plaquetas (26,27). As plaquetas, devido às suas características embriogénicas, bioquímicas e morfofuncionais, têm sido propostas como modelos periféricos dos neurónios monoamérgicos (28). Contudo, as plaquetas também captam as catecolaminas circulantes no plasma provenientes de várias áreas do corpo, e armazenam-nas por períodos relativamente longos, o que permite dissuadir possíveis diferenças regionais. Uma vez que as plaquetas não sintetizam catecolaminas, os seus conteúdos derivam inteiramente das catecolaminas libertadas na circulação e provenientes das terminações do SNS e das suprarrenais. Assim, elas poderão ser consideradas índices mais estáveis da actividade do SNS (26,27).

Alguns estudos anteriores demonstraram um aumento da actividade dos

nervos simpáticos (29,30) e um aumento da libertação pré-sináptica de neurotransmissores (31,32), o que sugere um envolvimento do SNS nas alterações cardiovasculares induzidas pela CsA. Os estudos por nós anteriormente realizados demonstraram alterações nos conteúdos plasmáticos e plaquetares de catecolaminas associadas ao tratamento com CsA (10). No estudo do IS-5-MN como terapêutica para a hipertensão arterial induzida pela CsA será sempre importante avaliar os possíveis benefícios, ou não, ao nível das pressões arteriais, mas também verificar se a administração do nitrato orgânico não altera a actividade do SNS pois, como é reconhecido, a utilização prolongada destes compostos poderá frequentemente resultar em contra-regulação neuro-hormonal compensatória (21,22).

O nosso estudo confirmou o desenvolvimento de hipertensão arterial associado ao tratamento com CsA. A administração de IS-5-MN, concomitante com o imunossupressor, resultou em efeitos distintos consoante a sua administração foi feita antes ou após o tratamento com CsA. Assim, se usado antes da administração de CsA, o IS-5-MN preveniu o aumento das pressões arteriais verificado no grupo a tomar só CsA. Contudo, se testado após o tratamento com CsA, o IS-5-MN não resultou em efeitos benéficos ao nível das pressões arteriais. Daqui se conclui que o IS-5-MN tem um efeito preventivo importante na HTA induzida pela CsA, mas não tem interesse se usado curativamente.

Relativamente aos valores de catecolaminas, a CsA produziu um efeito moderadamente activador do SNS, uma vez que os valores plasmáticos e plaquetares de catecolaminas foram apenas ligeiramente superiores aos do grupo

controlo. O tratamento com IS-5-MN+CsA resultou em um aumento da concentração de catecolaminas no plasma, sem igual desfecho ao nível das catecolaminas plaquetares, onde os valores *versus* CsA foram reduzidos. A primeira observação é a possibilidade de ocorrer uma alteração do normal equilíbrio plasma-plaquetas por efeito deste tratamento, depositando-se as catecolaminas no plasma sem se estabelecer um equilíbrio activo com a plaqueta que, em condições normais as absorve. O segundo ponto relevante é o próprio aumento dos valores *versus* grupo CsA, o que sugere um efeito activador do SNS originado pelo próprio nitrato orgânico. Esta suposição é reforçada pelo aumento verificado também no grupo que só tomou isoladamente o IS-5-MN. Contrariamente, no grupo CsA+IS-5-MN os valores obtidos não representam igual aumento dos valores plasmáticos de catecolaminas *versus* grupo controlo. Daqui resulta que, tal como previamente hipotetizado, o tratamento com IS-5-MN promove um aumento dos níveis de catecolaminas no plasma, possivelmente como resultado de uma activação do sistema nervoso simpáticos resultante de contra-regulação neuro-hormonal. Contudo, é ainda muito relevante verificar que este efeito ocorre se o IS-5-MN for administrado de forma preventiva, antes do estabelecimento das alterações por efeito da CsA, mas não de forma regressiva ou curativa, após os distúrbios terem ocorrido.

A hipótese da activação simpática se relacionar positivamente com o agravamento das pressões arteriais não se confirma porque no grupo IS-5-MN+CsA ocorre um aumento das catecolaminas no plasma *versus* grupo CsA e, paralelamente, há uma preven-

ção da hipertensão arterial. Contrariamente, no grupo CsA+IS-5-MN não há o mesmo aumento das catecolaminas no plasma mas, contudo, as pressões arteriais elevadas do grupo CsA não regridem, verificando-se mesmo um agravamento. Isto parece indicar que a hiperactivação simpática não é o factor decisivo para o desenvolvimento de HTA induzida pela CsA. Os benefícios de uma possível normalização dos níveis de NO-GMPc para a reactividade vascular e HTA induzidas pela CsA deverão sobrepor-se àquele agravamento simpático.

Em conclusão, o tratamento concomitante do IS-5-MN com a CsA, se aplicado de forma preventiva, mas não após o estabelecimento das alterações induzidas por tratamento prévio com a CsA, poderá vir a ser considerado uma terapêutica válida para a prevenção da hipertensão arterial induzida pela CsA.

Agradecimentos

Este trabalho teve a colaboração da Novartis Farma (Lisboa, Portugal) pela gentil cedência da Ciclosporina A (Sandimmune Neoral[®]) e da Ferraz-Lynce (Lisboa, Portugal) pela amável oferta do 5-Mononitrato de Isossorbido (Monopront[®]). O nosso agradecimento especial também para a Bristol Myers Squibb pelo apoio financeiro ao projecto.

Morada para envio de correspondência:

Prof. Doutor Frederico Teixeira

Instituto de Farmacologia e Terapêutica Experimental

Faculdade de Medicina – Universidade de Coimbra

3004-504 Coimbra, Portugal

E-mail: fredjt@ci.uc.pt;

Tel.: 239 857777; Fax.: 239 836200

Referências

1. McNally PG, Feehally J. Pathophysiology of cyclosporin A nephrotoxicity: experimental and clinical observations. *Nephrol Dial Transplant* 1992; 7: 791-804.

2. Sander M, Victor RG. Hypertension after cardiac transplantation: pathophysiology and management. *Curr Opin Nephrol and Hypertens* 1995; 4: 443-451.
3. Vanrenterghem Y, Roels L, Lerut T et al. Thromboembolic complications and haemostatic changes in cyclosporin-treated cadaveric kidney allograft recipients. *Lancet* 1985; i: 999-1002.
4. Cartier R, Dagenais F, Hollmann C, Cambron H and Buluran J. Chronic exposure to cyclosporine affects endothelial and smooth muscle reactivity in the rat aorta. *Ann Thorac Surg* 1994; 58: 789-794.
5. Reis F, Tavares P, Rito LC, Teixeira HM, Santos-Dias JD, Ferrer-Antunes CA, Mesquita JF, Teixeira F. Platelet activation is increased in cyclosporin A-induced hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000; 36 (1): 56-64.
6. Rego A, Vargas R, Suarez KR, Foegh ML, Ramwell PW. Mechanism of cyclosporine potentiation of vasoconstriction of the isolated rat mesenteric arterial bed: role of extracellular calcium. *J Pharmacol Exp Ther* 1990; 254: 799-808.
7. Reis F, Tavares P, Fontes-Ribeiro CA, Ferrer-Antunes C, Teixeira F. The peripheral serotonergic system and platelet aggregation in cyclosporin A-induced hypertensive rats. *Thromb Res* 1999; 96: 365-372.
8. Haug C, Duell T, Voisard R, Lenich A, Kolb HJ, Mickley V, Homback V, Grunert A. Cyclosporine A stimulates endothelin release. *J Cardiovasc Pharmacol* 1995; 26: S239-S241.
9. Lee DBN. Cyclosporine and the renin-angiotensin axis. *Kidney Int* 1997; 52: 248-260.
10. Reis F, Tavares P, Teixeira F. The distribution of catecholamines between plasma and platelets in cyclosporin A-induced hypertensive rats. *Pharmacol Res* 2000; 41 (2): 129-135.
11. Stephan D, Billing A, Krieger JP, Erima M, Fabre M, Hafner M, Imbs JL, Barthelmebs M. Endothelium-dependent relaxation in the isolated rat kidney: impairment by cyclosporine A. *J Cardiovasc Pharmacol* 1995; 26: 859-868.
12. Zoja C, Furci L, Ghilardi F, Zilio P, Benigni A, Remuzzi G. Cyclosporin-induced endothelial cell injury. *Lab Invest* 1986; 55: 455-462.
13. Rego A, Vargas R, Wroblewska B, Foegh ML, Ramwell PW. Attenuation of vascular relaxation and cyclic GMP responses by cyclosporin A. *J Pharmacol Exp Ther* 1990; 252: 165-170.
14. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43: 109-142.
15. Luscher TF, Noll G. The pathogenesis of cardiovascular disease: role of the endothelium as a target and mediator. *Atherosclerosis* 1995; 118 (Suppl.): S81-S90.
16. Oriji GK, Keiser HR. Role of nitric oxide in cyclosporin A-induced hypertension. *Hypertension* 1998; 32: 849-855.
17. Akita K, Dusting GJ, Hickey H. Suppression of nitric oxide production by cyclosporin A and FK506 in rat vascular smooth muscle cells. *Clin Exp Pharmacol* 1994; 21: 231-233.
18. Kim HS, Kim DH, Kang SW, Choi KH, Lee HY, Han DS, Lee YH, Kang BS. L-Arginine restores suppressed acetylcholine-induced endothelium-dependent vascular relaxation in cyclosporin A-treated rats. *Transplant Proc* 1996; 28 (3): 1372-1374.
19. Lee J, Kim SW, Kook H, Kang DG, Kim NH, Choi KC. Effects of L-arginine on cyclosporin-induced alterations of vascular NO/cGMP generation. *Nephrol Dial Transplant* 1999; 14: 2634-2638.
20. Yang CW, Kim YS, Kim J, Kim YO, Min SY, Choi EJ, Bang BK. Oral supplementation of L-arginine prevents chronic cyclosporine nephrotoxicity in rats. *Exp Nephrol* 1998; 6: 50-56.
21. Parker JD, Parker JO. Nitrate therapy for stable angina pectoris. *Drug Ther* 1998; 338 (8): 520-531.
22. Megson IL. Nitric oxide donor drugs. *Drug Fut* 2000; 25 (7): 701-715.
23. Smith CCT, Curtis LD, Delamothe AP, Prichard BNC, Betteridge DJ. The distribution of catecholamines between platelets and plasma in normal human subjects. *Clin. Sci.* 1985; 69: 1-6.
24. Mancina G, Di Rienzo M, Giannattasio C, Parati G, Grassi G. Early and late sympathetic activation in hypertension. *Scand Cardiovasc J Suppl* 1998; 49: 9-14.
25. Prados P, Santa T, Homma H, Doi H, Narita H, Del Castillo B, Martin MA, Imai K. Comparison of the sympathetic nervous system activity between spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats

- to responde to blood pressure reduction. *Biol Pharma Bull* 1997; 20: 341-344.
26. Chanberlain KG, Pestell RG, Best JD. Platelet catecholamine contents are cumulative indexes of sympathoadrenal activity. *Am J Physiol* 1990; 259: 141-147.
27. Ueda E, Kuchii M, Hano T, Ueno Y, Jo Y, Shima H, Nishio I, Masuyama Y. Platelet noradrenaline content as an integrated measure of variations in plasma noradrenaline. *Jpn Circ J* 1990; 54: 383-390.
28. Stahl SM. Platelets as pharmacologic models for the receptors and biochemistry of monoaminergic neurons. In: Longenecker GL, eds. *The platelets: physiology and pharmacology*. London: Academic Press, 1985: 307-340.
29. Moss NG, Powell SL, Falk RJ. Intravenous cyclosporine activates afferent and efferent renal nerves and causes sodium retention in innervated kidneys in rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 8222-8226.
30. Murray BM, Paller MS, Ferris TF. Effects of cyclosporine administration on renal hemodynamics in conscious rats. *Kidney Int* 1985; 28: 767-774.
31. Xue H, Buroski RD, McCarron DA, Bennett WM. Induction of contraction in isolated rat aorta by cyclosporine. *Transplantation* 1987; 43: 715-718.
32. Golub MS, Berger ME. Direct augmentation by cyclosporin A of the vascular contractile response to nerve stimulation. *Hypertension* 1987; 9: 96-100.

MEIOS UMA DOR DE CABEÇA