

EFEITO DO 5-MONONITRATO DE ISOSSORBIDO NA REACTIVIDADE PLAQUETÁRIA DE RATOS TRATADOS COM CICLOSPORINA A

Luísa Ponte¹, Flávio Reis¹, Luís Rocha¹, Luís Almeida¹, Teresa Alcobia¹, Margarida Lourenço², Aida Palmeiro², C.A. Ferrer-Antunes², Frederico Teixeira¹

RESUMO

Uma das principais explicações para o aumento da reactividade vascular e plaquetária associado à hipertensão arterial e desenvolvimento de complicações tromboembólicas induzidas pela ciclosporina A (CsA) é a existência de alterações relevantes ao nível do sistema NO-GMPc.

Pretendeu-se com este trabalho estudar o efeito da administração concomitante com a CsA de um dador de NO (o 5-Mononitrato de Isossorbido – IS-5-MN) na reactividade plaquetária de ratos tratados com CsA. Em particular, pretendeu-se avaliar os efeitos do IS-5-MN na agregação plaquetária e ao nível da produção/libertação plaquetária de 5-HT e de TXA₂.

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 com CsA promoveu um aumento significativo da concentração de 5-HT no plasma, versus grupo controlo. Os valores plaquetários da amina foram idênticos. Tanto no grupo IS-5-MN+CsA como no grupo CsA+IS-5-MN foi registado um valor plaquetário de 5-HT superior ao grupo CsA. Contudo, apenas no grupo IS-5-MN+CsA foi obtida uma redução significativa de 5-HT no plasma relativamente ao controlo.

O grupo tratado com CsA revelou uma libertação plaquetária de TXA₂ superior ao controlo, sem que o valor no plasma fosse significativamente diferente entre os 2 grupos. No grupo IS-5-MN+CsA o valor encontrado não diferiu estatisticamente do grupo CsA. Contudo, quando o tratamento com IS-5-MN foi feito após prévia administração de CsA (grupo CsA+IS-5-MN) a libertação plaquetária de TXA₂ foi muito superior ao grupo CsA. A concentração plasmática de TXA₂ foi reduzida no grupo IS-5-MN+CsA e agravada no grupo CsA+IS-5-MN, comparativamente ao grupo CsA. A agregação plaquetária ao ADP e ao colagénio variou em concordância com as alterações plasmáticas dos dois agentes. Ou seja, a hiper-agregabilidade plaquetária do grupo CsA, versus control, foi prevenida pelo tratamento prévio com IS-5-MN e não foi significativamente alterada no grupo com administração prévia de CsA (grupo CsA+IS-5-MN).

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 Hematologia, Hospitais da Universidade de Coimbra

Em conclusão, os efeitos benéficos da administração conjunta de IS-5-MN com a CsA verificaram-se quando usado preventivamente, uma vez que diminui a agregação plaquetária e os níveis de 5-HT e TXA₂ no plasma. O tratamento com IS-5-MN poderá, pois, vir a desempenhar um papel importante como terapêutica preventiva da hipertensão arterial e desenvolvimento de complicações cardiovasculares induzidos pela CsA.

ABSTRACT

One of the main explanations for the vascular and platelet reactivity rise associated with CsA-induced arterial hypertension and thromboembolic complications development is the occurrence of relevant NO-cGMP system changes.

This work intended to study the effect of concomitant administration with the CsA of an organic NO donor (the Isosorbide 5-Mononitrate – IS-5-MN) on the platelet reactivity of CsA-treated rats. Particularly, to estimate the IS-5-MN effects on platelet aggregation and on platelet 5-HT and TXA₂ production/release.

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).

CsA treatment promoted a significant plasma 5-HT concentration increase, versus the control group. The platelet amina values were identical. Both in the IS-5-MN+CsA and in the CsA+IS-5-MN group a higher platelet 5-HT value was obtained when compared with the CsA group. However, only in the IS-5-MN+CsA group a significant plasma 5-HT content reduction was obtained versus the control.

The CsA treatment revealed a higher platelet TXA₂ release than the control, without a significant difference between the plasma values of the 2 groups. In the IS-5-MN+CsA group, the value encountered did not statistically differ from the CsA group. However, when the IS-5-MN treatment was made after previous CsA administration (CsA+IS-5-MN group) the platelet TXA₂ release was much higher than the CsA group. Plasma TXA₂ concentration was reduced in the IS-5-MN group and worsened in the CsA+IS-5-MN group, when compared with the CsA group. ADP and collagen-induced platelet aggregation were changed according to the plasma changes of the two agents. That is, the CsA group platelet hyper-aggregability, versus the control, was prevented by the previous treatment with IS-5-MN, and was not significantly changed in the group that received previous CsA administration (CsA+IS-5-MN group).

In conclusion, the beneficial effects of concomitant IS-5-MN treatment with CsA occurred when preventively used, since platelet aggregation and plasma 5-HT and TXA₂ levels were reduced. The IS-5-MN treatment might, thus, have an important role as preventive therapy for CsA-induced arterial hypertension and thromboembolic complications development.

INTRODUÇÃO

A utilização da ciclosporina A (CsA) como fármaco imunossupressor para prevenir a rejeição de órgãos em doentes transplantados (1,2) tem estado associada a alguns efeitos secundários graves, nomeadamente nefrotoxicidade, hipertensão arterial (HTA) e aumento do risco de complicações tromboembólicas (3-6).

O monóxido de azoto (NO) possui propriedades de vasodilatador e anti-agregante plaquetário, desempenhando um papel importante na fisiologia e fisiopatologia cardiovasculares (7,8). Alterações do sistema NO-GMPc poderão, pois, estar associadas a distúrbios graves da funcionalidade vascular e plaquetária, tal como acontece em outras patologias do foro cardiovascular (9,10). Alguns estudos recentes apontam para uma diminuição da via NO-GMPc (11,12) associada às complicações vasculares/plaquetárias na HTA induzida pela CsA (13-15). No entanto, a administração conjunta de L-arginina (o substrato natural da NO Sintetase – NOS), apesar de corrigir aquelas alterações, não impediu o desenvolvimento de hipertensão arterial em ratos tratados com CsA (16).

O objectivo deste trabalho foi o de avaliar o efeito da administração concomitante com a CsA de um dador de NO (o 5-Mononitrato de

Isossorbido – IS-5-MN) na reactividade plaquetária de ratos tratados com CsA. Pretende-se estudar os efeitos do IS-5-MN na agregação plaquetária e ao nível da produção/libertação plaquetária de serotonina (5-HT) e de tromboxano A₂ (TXA₂).

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 através de uma cânula esofágica, sempre entre as 17 e as 18 horas. A administração bidária assimétrica de ISMN efectuou-se entre as 10 e as 11 horas e entre as 17 e as 18 horas de cada dia.

2 – Concentração plaquetária e plasmática de serotonina

2.1 – 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, 15 a 20°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.

O pellet de plaquetas foi ressuspensão em 1 ml de tampão fosfato 0,1M, sendo depois adicionado ácido ascórbico (20 µM) para impedir a degradação metabólica. Procedeu-se então à desproteínização com 120 µl de ácido perclórico a 70 % (1:10; v/v). De modo a assegurar uma correcta desproteínização e extracção das aminas, as amostras foram vigorosamente homogeneizadas em “vórtex” e colocadas a 4° C durante 15 min. Finalmente, e após nova homogeneização, procedeu-se à recolha da serotonina e do 5-HT contidos no sobrenadante resultante de uma centrifugação a 1200 g (15 min, a 10° C).

Ao PPP (1 ml) foi igualmente adicionado ácido ascórbico (40 µM) e depois 1 ml de uma solução de ácido perclórico 3M com EDTA a 1%. Fez-se vórtex e deixou-se durante a noite a 4° C. Por fim, centrifugou-se a amostra a 1200 g (15 min a 4° C) e guardou-se o sobrenadante para doseamento da serotonina.

2.2 – Quantificação da concentração plaquetária e plasmática de

serotonina

Para a quantificação da serotonina utilizou-se um sistema HPLC-ECD (Gilson Applied Chromatographic System, Middleton, E.U.A.) provido com bomba, sistema de injeção automático com “loop” de 50 µl, detector electroquímico munido com um eléctrodo de trabalho de carbono vítrio e um eléctrodo de referência Ag/AgCl, a um potencial de 650 mV (sensibilidade ajustada a 2 nA/V). Foi utilizada uma coluna de fase reversa C18 Biophase ODS (Bioanalytical Systems Inc., West Lafayette, E.U.A.) de 250 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno, com 5 µm de diâmetro das partículas. A fase móvel, constituída 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 dibutilamina (1mM), foi previamente filtrada através de filtros de HPLC (Ø 0,2 µm/50 mm, Schleicher e Schuell, Dassel, Alemanha). O registo dos cromatogramas foi feito através de software apropriado (“Gilson 710”). A concentração de serotonina presente nas amostras foi calculada tendo como referência uma solução padrão de creatinina-sulfato de serotonina de concentração conhecida (1 mg/ml), preparado em ácido perclórico (0,1 N) e mantido a 4°C. Os valores foram expressos em pg/10⁹ plaquetas/ml e em ng/ml para as amostras de plaquetas e plasma, respectivamente.

3 – Concentração plaquetária e plasmática de tromboxano A₂

3.1 – Colheita do sangue e preparação das amostras

O sangue para doseamento de TXA₂ nas plaquetas e no plasma foi colhido segundo os procedimentos atrás descritos. A fim de activar as plaquetas a produzirem TXA₂, adicionou-se a 0,5 ml de PRP ácido araquidónico (120 µM – concentração final) e incubou-se a 37° C durante 5 min. Parou-se a reacção, colocando em gelo durante 1 a 2 minutos e adicionou-se em seguida indometacina (110 µM – concentração final). Centrifugaram-se as amostras a 1500 g (4° C, durante 10 min) e recolheu-se o sobrenadante para posterior extracção. Às amostras de plasma foi também adicionada a indometacina a igual concentração.

3.2 – Extracção e quantificação da concentração plaquetária e plasmática de TXA₂

Com o objectivo de eliminar contaminações e concentrar a amostra procedeu-se à extracção do TXA₂ pela técnica de extracção fase líquida. A cada ml de amostra biológica adicionaram-se 2 ml de acetona, levou-se ao vórtex e colocou-se 2 min a agitar num agitador mecânico. Em seguida, centrifugou-se a 1500 g, à temperatura de 4° C e durante 10 min. Recolheu-se o sobrenadante e adicionaram-se 2 ml de hexano. Agitou-se no vórtex e centrifugou-se nas condições anteriores. Obtiveram-se 2 fases e desprezou-se a parte superior que continha o hexano. À camada inferior adicionou-se ácido

cítrico 1,0 M de forma a ajustar o pH ao valor de 3 a 4. Por último adicionou-se 2 ml do solvente orgânico clorofórmio. Agitou-se novamente no vórtex e centrifugou-se. Obtiveram-se 2 fases. Recolheu-se a fase superior e procedeu-se à re-extracção com 2 ml de clorofórmio e guardou-se a fase inferior que contém o TXA₂ extraído. Combinaram-se os 2 extractos e secou-se num sistema de vácuo. Ressuspendeu-se a amostra em 250 µl de tampão de ensaio (fosfato) fornecido com o kit. O TXB₂ (o produto equimolar estável da metabolização de TXA₂) presente nas amostras foi quantificado por intermédio de um kit de imunoenensaio enzimático comercialmente disponível (Biotrank System, Amersham Biosciences, Reino Unido), procedendo-se de acordo com as indicações descritas no mesmo. As placas foram lidas a um comprimento de onda de leitura de 450 nm e de correcção de 600 nm. Os valores presentes nas amostras foram finalmente calculados por extrapolação da curva padrão, sendo as concentrações expressas em pg/10⁹ plaquetas/ml e em pg/ml para as amostras de plaquetas e de plasma/soro, respectivamente.

4 – Agregação plaquetária em sangue total

A colheita de sangue foi feita como anteriormente descrito, para seringas contendo 20 U/ml de heparina. As amostras de sangue total foram depois diluídas em partes iguais com soro fisiológico e mantidas a 37° C, sob agitação, durante 5 min,

imediatamente antes da adição dos agentes estimulantes da agregação plaquetária. Foram utilizados como agregantes plaquetários o ADP e o colagénio, nas concentrações de 1 µM e de 5 µg/ml, respectivamente. A avaliação da agregação plaquetária em sangue total foi realizada num lumiagregómetro Chronolog-modelo 500 (Havertown, E.U.A.), pelo método da impedância eléctrica, que se baseia na detecção de alterações da resistência eléctrica entre dois eléctrodos submersos na amostra (17). Os valores da agregação plaquetária máxima, expressa em ohms, correspondem à amplitude da curva do gráfico da variação da impedância (em ohms) ao longo do tempo.

5 – Reagentes

Os solventes utilizados para a quantificação cromatográfica de serotonina possuem um alto grau de pureza, tal como requerido para a análise cromatográfica (Lichrosolv da Merck, Darmstadt, Alemanha), enquanto que para a preparação das amostras é requerido um grau de pureza analítico (proanálise da Merck, Darmstadt, Alemanha). A creatinina-sulfato de serotonina e os restantes reagentes utilizados foram obtidos na Sigma Chemical Co. (St. Louis, E.U.A). Os kits de radioimunoensaio foram adquiridos à (Biotrank System, Amersham Biosciences, Reino Unido). Nos estudos de agregação plaquetária foi utilizado o ADP e o colagénio (tipo I, de origem equina) provenientes da ChronoLog Corp. (Havertown, E.U.A.). Os restantes

reagentes foram obtidos através da Sigma Chemicals Co. (St. Louis, E.U.A.).

6 – 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 teste 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 – Concentração plaquetária e plasmática de serotonina

A concentração de 5-HT nas plaquetas e 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).

No grupo tratado com CsA verificou-se uma menor concentração plaquetária de 5-HT (629 ± 46 pg/10⁹plaq./ml), não estatisticamente

significativa, relativamente ao grupo controlo (673 ± 34 pg/10⁹plaq./ml) (Fig. 1A).

No grupo tratado com IS-5-MN+CsA o conteúdo plaquetário de 5-HT foi significativamente superior (1012 ± 60 pg/10⁹plaq./ml; $P < 0,001$) ao grupo tratado com CsA (Fig. 1A). Igual comportamento, ainda mais acentuado, se verificou no grupo que iniciou o tratamento com CsA (CsA+IS-5-MN), cujo valor encontrado foi de 1715 ± 115 pg/10⁹plaq./ml ($P < 0,001$). Os valores dos dois grupos tratados simultaneamente com IS-5--MN e CsA foram estatisticamente significativos entre si ($P < 0,001$).

No grupo tratado somente com IS-5-MN o valor obtido (529 ± 11 pg/10⁹plaq./ml) não diferiu significativamente dos valores dos grupos controlo e CsA, sendo significativamente menor ($P < 0,001$) relativamente aos grupos IS-5-MN+CsA e CsA+IS-5--MN (Fig. 1A).

A concentração plasmática de 5-HT do grupo tratado com CsA foi significativamente superior ($3,04 \pm 0,54$ ng/ml; $P < 0,01$) à obtida no grupo controlo ($0,91 \pm 0,27$ ng/ml) (Fig. 1B).

No tratamento com IS-5-MN+CsA verificou-se uma menor concentração plasmática de 5-HT ($1,39 \pm 0,68$ ng/ml; $P < 0,05$) *versus* grupo CsA, contrariamente ao grupo CsA+IS-5-MN, cuja concentração de 5-HT no plasma ($2,55 \pm 0,59$ ng/ml) não diferiu significativamente do grupo CsA (Fig. 1B).

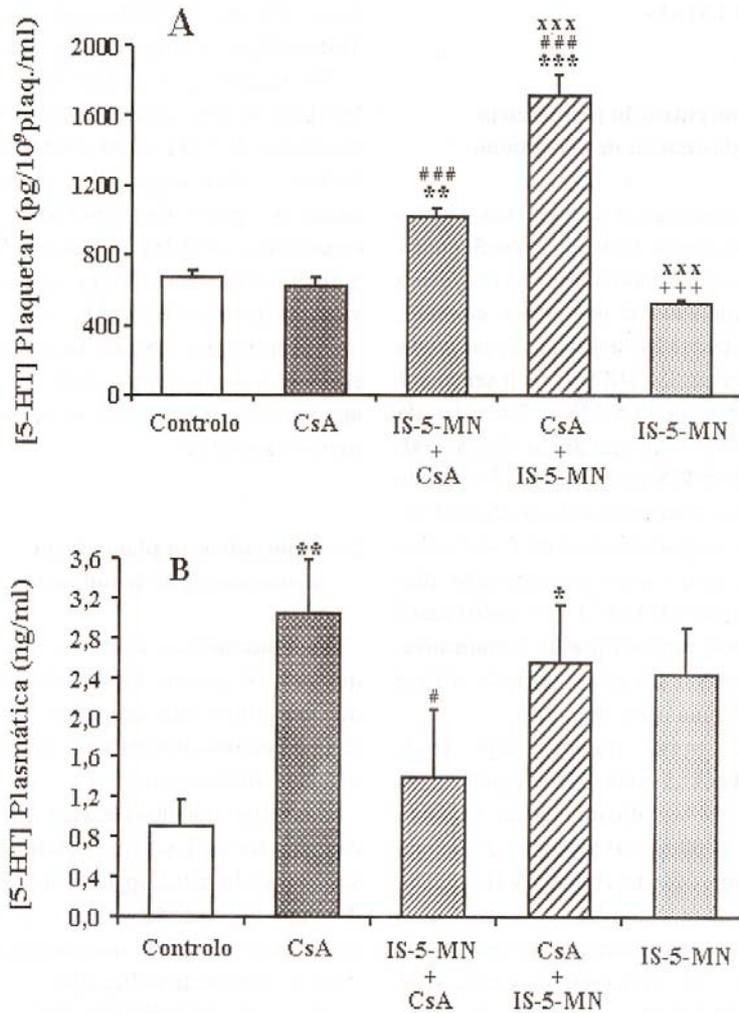


Fig. 1 - Concentração plaquetária (A) e plasmática (B) de serotonina nos ratos dos grupos controlo, CsA, IS-5-MN+CsA, CsA+IS-5-MN e IS-5-MN, após os correspondentes períodos de tratamento. Os valores representam médias \pm e.p.m. As diferenças estatisticamente significativas estão expressas através dos símbolos (* = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$; *** = $P < 0,001$: vs o grupo controlo; # = $P < 0,05$; ### = $P < 0,001$: vs o grupo tratado com CsA; **** = $P < 0,001$: vs o grupo IS-5-MN+CsA; ***** = $P < 0,001$: vs o grupo CsA+IS-5-MN)

No grupo tratado com IS-5-MN foi encontrado um valor ($2,42 \pm 0,47$ ng/ml) não estatisticamente significativo dos anteriores.

2 - Concentração plaquetária e plasmática de tromboxano A₂

A concentração de TXA₂ nas plaquetas e no plasma foi medida em

todos os grupos em avaliação, no fim dos respectivos tratamentos, conforme indicado atrás.

No grupo tratado com CsA foi obtido um valor de TXA₂ plaquetário muito superior ($2,18 \pm 0,22$ pg/10⁹ plaq./ml) ao do grupo controlo ($1,02 \pm 0,20$ pg/10⁹ plaq./ml), ainda que não estatisticamente significativo (Fig. 2A).

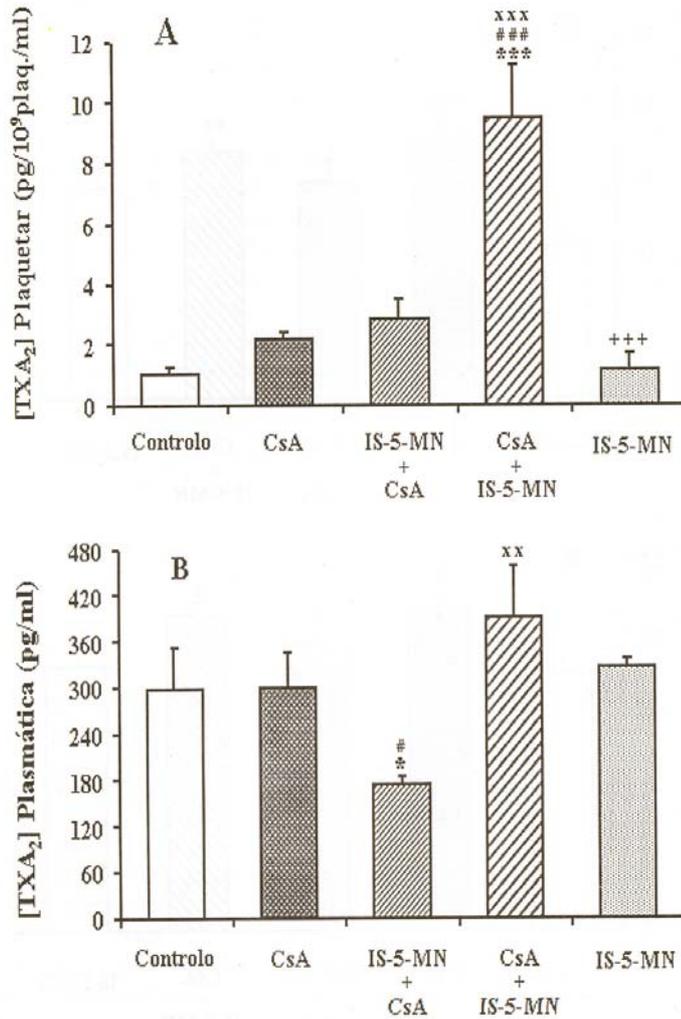


Fig. 2 – Concentração plaquetária (A) e plasmática (B) de tromboxano A₂ nos ratos dos grupos controlo, CsA, IS-5-MN+CsA, CsA+IS-5-MN e IS-5-MN, após os correspondentes períodos de tratamento. A libertação plaquetária foi estimulada com ácido araquidónico (120 μM). Os valores representam médias ± e.p.m. As diferenças estatisticamente significativas estão expressas através dos símbolos (* = P<0,05; *** = P<0,001: vs o grupo controlo; # = P<0,05; ### = P<0,001: vs o grupo tratado com CsA; xx = P<0,01; xxx = P<0,001: vs o grupo IS-5-MN+CsA; +++ = P<0,001: vs o grupo CsA+IS-5-MN)

No grupo tratado inicialmente com IS-5-MN (IS-5-MN+CsA) o valor encontrado ($2,83 \pm 0,68$ pg/10⁹plaq./ml) não diferiu estatisticamente do grupo CsA. Contudo, quando o tratamento com IS-5-MN foi feito após prévia administração de CsA (grupo CsA+IS-5-MN) a concentração plaquetária de

TXA₂ ($9,54 \pm 1,69$ pg/10⁹plaq./ml; $P<0,001$) foi estatisticamente muito superior ao grupo CsA (Fig. 2A).

No grupo tratado somente com IS-5-MN a concentração plaquetária de TXA₂ ($1,08 \pm 0,57$ pg/10⁹plaq./ml) foi semelhante ao grupo controlo ($1,02 \pm 0,20$ pg/10⁹plaq./ml) (Fig. 2A).

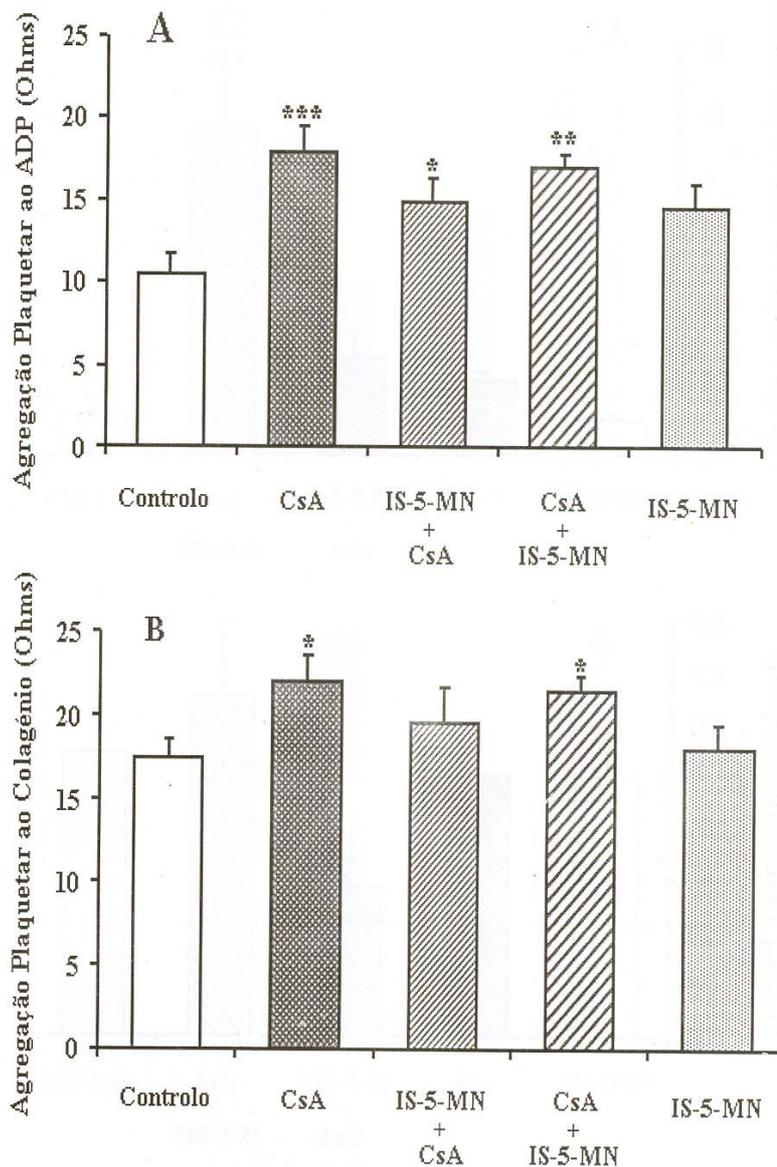


Fig. 3 – Agregação plaquetária em sangue total após estimulação com 1 μ M de ADP (A) ou 5 μ g/ml de colagénio (B) nos ratos dos grupos controlo, CsA, IS-5-MN+CsA, CsA+IS-5-MN e IS-5-MN, após os correspondentes períodos de tratamento. Os valores representam médias \pm e.p.m. As diferenças estatisticamente significativas estão expressas através dos símbolos (* = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$; *** = $P < 0,001$: vs o grupo controlo)

A concentração de TXA_2 no plasma foi semelhante no grupo controlo ($298,88 \pm 52,65$ pg/ml), no grupo CsA ($299,01 \pm 44,96$ pg/ml) e no grupo IS-5-MN ($326,70 \pm 10,21$ pg/ml) (Fig. 2B).

O grupo tratado com IS-5-MN+CsA registou uma menor concentração plasmática de TXA_2

($172,70 \pm 13,18$ pg/ml; $P=0,067$) comparativamente ao grupo CsA. Contrariamente ao grupo tratado com CsA+IS-5-MN, cuja concentração plasmática de TXA_2 foi de ($509,93 \pm 83,48$ pg/ml), estatisticamente significativo relativamente ao grupo IS-5-MN+CsA ($P < 0,01$) (Fig. 2B).

3 – Agregação plaquetária em sangue total

Em resposta ao ADP, as plaquetas do grupo CsA mostraram maior agregação ($18,00 \pm 1,48$ ohms; $P < 0,001$), comparativamente ao grupo controlo ($10,43 \pm 1,33$ ohms). No grupo IS-5-MN o valor obtido ($14,50 \pm 1,56$ ohms) foi superior ao controlo, mas não de modo estatisticamente significativo (Fig. 3A).

Quando a CsA foi administrada concomitantemente com o IS-5-MN verificou-se que no grupo tratado previamente com IS-5-MN (grupo IS-5-MN+CsA) o valor ($14,83 \pm 1,49$ ohms, $P < 0,05$) ainda que superior ao controlo, se aproxima do grupo tratado somente com IS-5-MN ($14,50 \pm 1,56$ ohms), enquanto que o tratamento com IS-5-MN após a administração de CsA (grupo CsA+IS-5-MN) resultou em agregabilidade superior ($17,00 \pm 0,89$ ohms; $P < 0,01$) ao controlo ($10,43 \pm 1,33$ ohms) e semelhante ao grupo CsA ($18,00 \pm 1,48$ ohms) (Fig. 3A).

Quando a agregação plaquetária em sangue total foi estimulada com o colagénio (Fig. 3B), no grupo CsA ($22,00 \pm 1,53$ ohms; $P < 0,05$) verificou-se um valor superior ao do grupo controlo ($17,43 \pm 1,09$ ohms).

O tratamento com IS-5-MN antes da administração concomitante com CsA (grupo IS-5-MN+CsA) resultou em menor agregação ($19,50 \pm 2,20$ ohms) do que no grupo CsA; contrariamente ao grupo CsA+IS-5-MN, cujo valor ($21,40 \pm 0,87$ ohms) se aproxima do do grupo CsA (Fig. 3B).

O grupo tratado somente com IS-5-MN teve um valor de agregação em

sangue total em resposta ao colagénio ($18,00 \pm 1,47$ ohms) semelhante ao grupo controlo (Fig. 3B).

DISCUSSÃO

A utilização terapêutica de fármacos dadores de NO na HTA e complicações tromboembólicas induzidas pela CsA tem estado em destaque nos últimos anos. A administração do substracto natural da NOS, a L-arginina, tem produzido resultados muitos contraditórios, havendo sido descritos efeitos benéficos mas também ineficácia na prevenção ou reversão de tais alterações (16,18-20). Em estudo por nós realizado, a administração de L-arginina corrigiu as alterações nos conteúdos vasculares e plaquetários de NO e de GMPc mas não foi capaz de prevenir o desenvolvimento da HTA (16), o que sugere outras alterações no sistema NO-GMPc para além do bloqueio da síntese do NO ao nível do substracto. Na sequência deste resultado, foi ponderada então a utilização do nitrato orgânico IS-5-MN que, apesar de não ser usualmente utilizado para o tratamento da HTA (é sobretudo indicado para a angina de peito), poderá desempenhar um papel importante dadas as suas propriedades de dador de NO (21-23).

As plaquetas podem desempenhar um papel importante na fisiopatologia das doenças cardiovasculares, nomeadamente da HTA, e na patogénese da trombose. As plaquetas activadas são uma fonte de alguns dos mais potentes agentes vasoconstritores naturais, como os tromboxanos e

endoperóxidos. Muitos estudos demonstraram a existência de alterações plaquetárias resultantes do tratamento com a CsA, nomeadamente no equilíbrio tromboxanos/endoperóxidos (24,25), no aumento da hemostase e redução da trombólise (26,27), no aumento da agregabilidade e no sistema serotoninérgico periférico (28-30). A serotonina, armazenada maioritariamente nas plaquetas, está envolvida no desenvolvimento de complicações tromboembólicas e no aumento da pressão arterial (31,32). Quando activadas, as plaquetas aderem e agregam ao endotélio lesado, e libertam 5-HT e TXA₂ (entre outros compostos), que podem actuar como agentes vasoconstritores e pró-agregantes, promovendo a formação do trombo.

Os resultados obtidos indicam que o tratamento com CsA produz nos ratos um aumento da concentração de 5-HT no plasma relativamente ao grupo controlo. Uma vez que a plaqueta é o principal reservatório periférico de 5-HT, é de supor que esse conteúdo plasmático acrescido resulte de um aumento da libertação de 5-HT das plaquetas por aumento da sua actividade. Tal hiperreactividade plaquetária é confirmada pelo aumento da agregação em resposta quer ao ADP quer ao colagénio nos ratos tratados com CsA. A não obtenção de uma diminuição da concentração plaquetária de 5-HT poderá ficar a dever-se a alterações paralelas em um ou mais de outros mecanismos que regulam o “turnover” plaquetário de serotonina, tais como: a captação externa de 5-HT pela membrana da plaqueta; a captação

granular; ou a metabolização a ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA). Nos ratos tratados com IS-5-MN previamente à administração concomitante com CsA verificou-se um aumento significativo da concentração plaquetária de 5-HT, acompanhado por uma diminuição do conteúdo plasmático da amina, relativamente ao grupo tratado com CsA. Quando o IS-5-MN foi administrado após o tratamento com a CsA, o aumento da concentração de 5-HT nas plaquetas não resultou em diminuição significativa dos níveis no plasma. Os resultados obtidos no grupo tratado previamente com IS-5-MN, versus grupo CsA, poderão ser explicados à luz de uma diminuição da agregação plaquetária e consequente diminuição da libertação de 5-HT pelas plaquetas, quando comparada com o grupo CsA. Contudo, no grupo tratado com IS-5-MN posteriormente à administração conjunta com CsA, o aumento dos níveis de 5-HT nas plaquetas e no plasma e a não diminuição da agregação plaquetária, versus grupo CsA, apontam para outros factores conjugados, tais com alterações de captação e metabolização da serotonina.

Em suma, o tratamento com IS-5-MN, se usado preventivamente previne a agregação plaquetária e o aumento da concentração de 5-HT no plasma. Contudo, se usado para reverter os efeitos da CsA, não é eficaz uma vez que não diminui a agregação plaquetária nem o aumento do conteúdo plasmático de 5-HT, com os efeitos maléficos subjacentes a essa alteração fisiopatológica.

Relativamente ao conteúdo de TXA₂, o tratamento com CsA aumenta apenas ligeiramente os níveis de TXA₂ libertados pela plaqueta após estimulação com ácido araquidónico, sem alterações nos níveis no plasma, comparativamente ao grupo controlo. A administração de IS-5-MN, antes e após o tratamento conjunto com a CsA, resultou novamente em efeitos diferentes. Ao nível da libertação plaquetária verificou-se que ambos os grupos aumentaram o conteúdo de TXA₂. Segundos certos estudos (33,34) o IS-5-MN poderá influenciar a reactividade vascular e plaquetária, como agente vasorelaxante e anti-agregante, não apenas por influencia do sistema NO-GMPc mas também por um papel ao nível da via TXA₂/PGI₂. A confirmar-se esse efeito, ele seria, à partida, no sentido de um aumento da PGI₂ e/ou uma diminuição do TXA₂, promovendo assim a vasodilatação e a inibição da agregação plaquetária. Contudo, os nossos resultados opõem-se a essa ideia, havendo um aumento de TXA₂ quer o IS-5-MN seja fornecido antes ou depois da CsA. Outros estudos poderão auferir se estes resultados derivam de efeitos directos do IS-5-MN na via biossintética do TXA₂ ou de contra-regulações que se estabeleçam pela prolongada exposição ao vasodilatador ou pela presença da CsA.

Relativamente à concentração plasmática de TXA₂ os resultados foram mais elucidativos, verificando-se uma diminuição no grupo usado preventivamente (grupo IS-5-MN+CsA) e um aumento no grupo usado curativamente (grupo CsA+IS-5-MN), comparativamente ao grupo

tratado somente com CsA. Os valores foram mesmo significativos entre os dois grupos de IS-5-MN e CsA. Este resultado vai ao encontro das alterações da agregação plaquetária e também do conteúdo plasmático de 5-HT anteriormente descritos.

Em suma, o tratamento com IS-5-MN parece ter um papel importante na reactividade plaquetária dos ratos tratados com CsA, mas apenas se usado preventivamente, ou seja, administrado antes de se iniciar o tratamento concomitante com a CsA, uma vez que diminui a agregação plaquetária e os níveis de 5-HT e TXA₂ no plasma. A confirmar-se um efeito protector do IS-5-MN semelhante a nível da reactividade vascular, a administração do IS-5-MN poderá vir a ser considerada uma boa escolha como terapêutica preventiva da hipertensão arterial e desenvolvimento de complicações cardiovasculares induzidas 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. Kahan BD. Cyclosporine. *N Engl J Med* 1989; 321: 1725-1738.
2. Ponticelli C, Civati G, Tarantino A et al. Randomized study with cyclosporine in kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol* 1996; 7: 792-797.
3. McNally PG, Feehally J. Pathophysiology of cyclosporin A nephrotoxicity: experimental and clinical observations. *Nephrol Dial Transplant* 1992; 7: 791-804.
4. Ventura HO, Malik FS, Mehra MR, Stapleton DD, Smart FW. Mechanisms of hypertension in cardiac transplantation and the role of cyclosporine. *Curr Opin Cardiol* 1997; 4: 375-381.
5. 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.
6. Malyszko J, Malyszko JS, Pawlak K, Mysliwiec M. The coagulo-lytic system and endothelial function in cyclosporine-treated kidney allograft recipients. *Transplantation* 1996; 6: 828-830.
7. Luscher TF, Noll G. The pathogenesis of cardiovascular disease: role of the endothelium as a target and mediator. *Atherosclerosis* 1995; 118(Suppl.): S81-S90.
8. Radomski MW, Palmer RMJ, Moncada S. An L-arginine/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 5193-5197.
9. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43: 109-142.
10. Cadwgan TM, Benjamin N. Evidence for altered platelet nitric oxide synthesis in essential hypertension. *J Hypertens* 1993; 11: 417-420.
11. Oriji GK, Keiser HR. Role of nitric oxide in cyclosporin A-induced hypertension. *Hypertension* 1998; 32: 849-855.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. Santiago M, Reis F, Almeida L, Alcobia T, Dionísio J, Teixeira F. Impairment of vascular and platelet nitric oxide and 3',5' cyclic guanosine monophosphate content in cyclosporin A-induced hypertensive rats. *Fund Clin Pharmacol* 2003; 17: 43-50.
 16. Reis F, Santiago M, Almeida L, Alcobia T, Santos-Dias JD, Mesquita JF, Pontes F, Teixeira F. Isosorbide-5-mononitrate and L-arginine effect on the cyclosporin-induced arterial hypertension and vascular nitric oxide impairment. *Proc Eur Soc Microcirc* 2002; 257-261.
 17. Cardinal DC, Flower RJ. The electronic aggregometer: a novel device for assessing platelet behaviour in blood. *J. Pharmacol. Methods* 1980; 3: 135-158.
 18. O'Neil GS, Chester AH, Kushwaha S, Rose M, Tadjkarimi S, Yacoub MH. Cyclosporin treatment does not impair the release of nitric oxide in human coronary arteries. *Br Heart J* 1991; 66: 212-216.
 19. Stroes ES, Luscher TF, Groot FG, Koomans HA, Rabelink TJ. Cyclosporin A increases nitric oxide activity in vivo. *Hypertension* 1997; 29: 570-575.
 20. Hansen JM, Johansen NJ, Mollerup HM, Anderson NF, Strandgaard S. Effects of nitric oxide blockade and cyclosporin A on cardiovascular and renal function in normal man. *J Hypertens* 1999; 17: 1707-1713.
 21. Gunasekara NS, Noble S. Isosorbide 5-mononitrate. A review of a sustained-release formulation (Indur®) in stable pectoris angina pectoris. *Drugs* 1999; 57 (2): 261-277.
 22. Parker JD, Parker JO. Nitrate therapy for stable angina pectoris. *Drug Ther* 1998; 338 (8): 520-531.
 23. Megson IL. Nitric oxide donor drugs. *Drug Fut* 2000; 25(7): 701-715.
 24. González-Correa JA, De La Cruz JP, Lucena MI, Sánchez De La Cuesta F. The effect of cyclosporine A on platelet aggregation and thromboxane/prostacyclin balance in a model of extrahepatic cholestasis in the rat. *Thromb Res* 1996; 81: 367-381.
 25. Jorkasky DK, Fisher CA, Stahl RF, Addonizio VP, Glickman JD. The effects of cyclosporine on human platelet aggregation and thromboxane release. *Transplant Proc* 1989; 21: 948-949.
 26. Baker LRI, Tucker B, Kovacs IB. Enhanced in vitro hemostasis and reduced thrombolysis in cyclosporine-treated renal transplant recipients. *Transplantation* 1990; 49: 905-909.
 27. Levi M, Wilmink J, Buller HR, Surachno J, Ten Cate JW. Impaired fibrinolysis in cyclosporin-treated renal transplant recipients.

- Transplantation 1992; 54: 978-983.
28. 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.
 29. Ueda D, Suzuki K, Malyszko J, Pietraszek MH, Takada Y, Takada A, Kawabe K. Serotonergic measures in cyclosporine A treated rats. *Thromb Res* 1994; 76: 171-179.
 30. Malyszko J, Pawlak D, Pawlak K, Malyszko JS, Buczko W, Azzadin A and Mysliwiec M. Platelet aggregation and peripheral serotonergic system in kidney transplant recipients treated with cyclosporine. *Transplant Proc* 1996; 28: 1954-1957.
 31. Vanhoutte PM. Serotonin, hypertension and vascular diseases. *Neth J Med* 1991; 38: 35-42.
 32. Azzadin A, Mysliwiec J, Wollny T, Mysliwiec M, Buczko W. Serotonin is involved in the pathogenesis of hypertension developing during erythropoietin treatment in uremic rats. *Thromb Res* 1995; 77: 217-224.
 33. Wirthumer-Hoche C, Silberhauer K, Sinzinger H. Effect on nitroglycerin and other organic nitrates on the in-vitro biosynthesis of arachidonic acid-metabolites in washed human platelets. *Prostaglandin Leukot Med* 1984; 15: 317-323.
 34. Sinzinger H, Virgolini I, O'Grady J, Rauscha F, Fitsch P. Modification of platelet function by isosorbide dinitrate in patients with coronary artery disease. *Thromb Res* 1992; 65: 323-335.