

Efeitos Cardiovasculares da Ciclosporina num Modelo Experimental [12]

PAULA TAVARES, FLÁVIO REIS, C. A. FONTES RIBEIRO, FREDERICO TEIXEIRA

Unidade de Terapêutica – Instituto de Farmacologia e Terapêutica Experimental
Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra
Instituto de Climatologia e Hidrologia da Universidade de Coimbra

Rev Port Cardiol 2002;21 (2): 141-155

RESUMO

Objectivos: Estudo dos efeitos cardiovasculares e renais da ciclosporina (CsA), num modelo animal, com doses equivalentes à C_{min} e C_{max} da farmacocinética humana.

Métodos: Ratos Wistar machos (~300-400 g) foram tratados durante 7 semanas com CsA (Sandimmun Neoral®) dissolvida em sumo de laranja, nas doses de 5 e 30 mg/Kg/dia. Ao grupo controlo foi administrado apenas sumo de laranja nas mesmas condições. Foi determinada a pressão arterial (pelo método de «tail-cuff») e realizado o ECG em cada animal em estudo. Para além da determinação da ciclosporinémia foram também avaliados os níveis plasmáticos de lipídeos (triglicéridos, colesterol total e colesterol HDL), CPK, LDH, SGOT, sódio, potássio e creatinina, bem como os teores urinários de proteína.

Resultados: Após duas semanas de tratamento com CsA ambos os grupos apresentavam já hipertensão arterial (HTA), mas apenas o grupo tratado com 30 mg/Kg/dia apresentava taquicardia. O grupo tratado com 5 mg/Kg/dia apresentava também um aumento da pressão arterial diferencial. Também o perfil electrocardiográfico apresentou alterações que se podem resumir a um aumento do QTc e aumento de amplitude da onda T. No grupo de 30 mg/Kg/dia o ECG mostrou um perfil de cardiopatia isquémica acompanhado de aumento dos valores de CPK e SGOT mas sem alteração dos valores de LDH. Não se registou hipertrofia ventricular esquerda em nenhum dos grupos. Apesar do aumento dos

ABSTRACT

Cardiovascular Effects of Cyclosporin Treatment in an Experimental Model

Objective: This work aims to study the cardiovascular and renal effects of cyclosporin treatment. This purpose was achieved by using an animal model treated with cyclosporin in doses equivalent to the C_{min} and C_{max} values from human pharmacokinetics.

Methods: Wistar rats, weighing between 300 and 400 g, were treated with cyclosporin (Sandimmune Neoral®) for 7 weeks. The cyclosporin was diluted in orange juice and administered in two doses: 5 and 30 mg/kg/day. The control group received only orange juice. Blood pressure was evaluated by the tail-cuff method and an ECG was also performed. Besides blood cyclosporin levels, CPK, LDH, SGPT, SGOT, sodium, potassium and creatinine in serum and protein in urine, as well as plasma lipids (triglycerides, total and HDL cholesterol), were measured.

Results: Both doses of cyclosporin increased blood pressure but only 30 mg/kg/day induced tachycardia. Changes in electrocardiographic profile were also observed: an increase in QTc as well as an increase in T wave amplitude. Thus, the group treated with 30 mg/kg/day of cyclosporin showed an ischemic heart disease electrocardiographic profile which was reinforced by increased CPK, SGPT and SGOT but with no changes in LDH values. None of the cyclosporin-treated rats presented cardiac hypertrophy. Despite the increase in plasma lipids there was little or no increase in body weight, which was most

níveis de colesterol, os grupos tratados não aumentaram o peso corporal, de modo semelhante ao controlo principalmente o grupo tratado com 30 mg/Kg/dia. Os valores de Na⁺ e K⁺ plasmáticos não sofreram alteração, bem como os valores de creatinina plasmática ou proteína urinária.

Conclusão: Os resultados obtidos sugerem que os efeitos cardiovasculares da CsA no rato Wistar são precoces e se caracterizam por HTA e após 7 semanas de tratamento com doses elevadas (correspondente à C_{max} humana) por cardiopatia isquémica e taquicardia, mas após 7 semanas de tratamento sem hipertrofia ventricular esquerda. A dose inferior induz menores lesões cardíacas, aumentando, no entanto, a pressão arterial diferencial. A função renal (para ambas as doses de ciclosporina) apresentou-se sem alterações significativas, o que nos leva a sugerir que estas alterações, a virem a existir, serão posteriores às alterações cardiovasculares, nomeadamente à HTA.

Palavras-Chave

Ciclosporina; Cardiovascular; Ratos Wistar; Hipertensão

evident in the group that received 30 mg/kg/day of cyclosporin. No alterations were observed in serum Na⁺, K⁺ or creatinine values or in urine protein levels.

Conclusions: Our results showed that the cardiovascular effects of cyclosporin in Wistar rats are characterized by arterial hypertension, ischemic heart disease and tachycardia, but not cardiac hypertrophy. However, when these changes occur, kidney function seems to be normal. These facts suggest that cyclosporin-induced cardiovascular changes, particularly hypertension, are prior to renal damage. Moreover, our cyclosporin-induced hypertension model could be useful to study drugs that could treat or prevent these changes.

Key words

Cyclosporin; Cardiovascular; Wistar rats; Hypertension

INTRODUÇÃO

A ciclosporina (CsA) é um fármaco imunossupressor que muito tem contribuído para a sobrevivência de doentes transplantados. Pode mesmo dizer-se que a sua introdução na prática clínica marcou uma nova era na transplantação de órgãos. Não é contudo a CsA isenta de efeitos secundários, destacando-se entre estes o desenvolvimento de hipertensão arterial (HTA).

Poderá mesmo dizer-se que as propriedades imunossupressoras da CsA são quantitativamente paralelas ao desenvolvimento de HTA após transplante⁽¹⁾. Com efeito, embora estando descrito um aumento de 58 a 75% de taxa de sobrevivência em transplantados cardíacos com este tratamento⁽²⁾, a incidência de HTA aumentou, nesses mesmos doentes, de 20 para 90%^(3, 4, 5, 6). É mesmo genericamente calculado que a CsA confere um aumento de cerca de 30 vezes no risco de hipertensão, quando comparada com os imunossupressores convencionais. Esta hipertensão pode ser do tipo moderado a severo, requerendo tratamento com medicação

INTRODUCTION

Cyclosporin is an immunosuppressive drug that has contributed greatly to the survival of transplant patients. It could even be said that in clinical practice it marked the beginning of a new era in organ transplantation. However, cyclosporin is not without side-effects, the most important of which is arterial hypertension.

It actually appears that the immunosuppressive properties of cyclosporin are quantitatively parallel to the development of hypertension after transplantation⁽¹⁾. Indeed, although an increase of 58 to 75% in the survival rate of cardiac transplant patients is described for this treatment⁽²⁾, the incidence of hypertension in these patients has increased from 20 to 90%^(3, 4, 5, 6). It has been calculated that in general cyclosporin leads to a 30-fold increase in the risk of hypertension compared to conventional immunosuppressants. This hypertension may be moderate to severe, requiring treatment with antihypertensive drugs, and frequently leading to the failure of the transplant⁽¹⁾. At the

antihipertensiva e chegando muitas vezes a causar o insucesso do transplante⁽¹⁾. Por outro lado, à HTA induzida pela CsA pode associar-se, como factor de risco, o desenvolvimento de hipertrofia ventricular esquerda^(7, 8, 9) e a angiopatia periférica e coronária^(10, 11). Mais ainda, esta HTA aparece por vezes associada à toxicidade renal (como foi referido) e do sistema nervoso central. Por outro lado, a concomitante utilização de corticosteróides agrava a HTA induzida pela CsA⁽¹²⁾.

A ciclosporina poderá também interferir com o sistema renina-angiotensina-aldosterona. Com efeito, se há trabalhos que referem uma supressão da actividade da renina plasmática e hipo-aldosteronismo (apesar da expansão de volume do fluido extracelular)^(13, 14), outros autores, como Bellet et al.⁽²⁾, verificaram o contrário.

Todavia, apesar de há muito se utilizar em doentes, são ainda desconhecidos muitos dos efeitos celulares da CsA, até pela sua complexidade. Por isso, cada vez mais se recorre a estudos em modelos animais e celulares, no sentido de propor mecanismos que possam explicar, entre outros, o da indução de HTA. Incluído nesses objectivos, este trabalho visa validar um modelo animal de HTA induzida pela CsA: No rato Wistar, tratado com CsA em doses equivalentes às utilizadas em terapêutica humana e em que se estudaram os efeitos cardiovasculares e renais do tratamento com CsA.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Caracterização e distribuição dos animais

No presente estudo foram utilizados ratos Wistar, adultos, machos, com pesos entre os 300 e os 400 g (4 a 6 meses de idade). Os ratos foram adquiridos no Biotério Charles River (Barcelona) e mantidos durante as experiências no biotério do Núcleo de Terapêutica do Instituto de Farmacologia e Terapêutica Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra de acordo com as normas legislativas em vigor no nosso país. Os animais foram, assim, mantidos 4 a 5 por gaiola, com dieta sintética padronizada e água ad libitum, em condições de temperatura ($22\pm 1^\circ\text{C}$) e humidade ($50\pm 10\%$) controladas e ciclos de 12 h luz/escuro, de acordo com os parâmetros pré-estabelecidos para esta espécie. A dieta utilizada (LETICA, IPM-R20) continha todos os nutrientes necessários a estes animais, à ex-

same time, cyclosporin-induced hypertension may be a risk factor in the development of left ventricular hypertrophy^(7, 8, 9) and peripheral and coronary angiopathy^(10, 11). Furthermore, this hypertension is at times associated with renal toxicity (as already mentioned) and central nervous system toxicity. Moreover, the concomitant use of corticosteroids aggravates hypertension induced by cyclosporin⁽¹²⁾.

Cyclosporin may also interfere with the renin-angiotensin-aldosterone system. While some studies report suppression of plasma renin activity and hypoaldosteronism (despite the expansion in extracellular fluid volume)^(13, 14), other authors, such as Bellet et al.⁽²⁾, have found the opposite.

However, although cyclosporin has long been used in patients, many of its cellular effects are still unknown, to some extent due to their complexity. For this reason, studies using animal and cell models are increasingly used, with a view to discovering possible mechanisms that might explain, among other effects, the induction of hypertension. This work, which forms part of these efforts, sets out to validate an animal model of hypertension induced by cyclosporin in the Wistar rat, treated with cyclosporin in doses equivalent to those used in human therapy and studied for the cardiovascular and renal effects of treatment with cyclosporin.

METHODS

1. Characterization and distribution of the animals

The present study used adult male Wistar rats, weighing between 300 and 400 g (4-6 months of age). The rats were acquired from Charles River Laboratories (Barcelona) and during the experiments were kept in the Therapeutics Unity of the Institute of Pharmacology and Experimental Therapy of the Faculty of Medicine of Coimbra University in accordance with the standards laid down by Portuguese law. The animals were thus kept 4 or 5 to a cage, on a standardized synthetic diet and with free access to water, under controlled conditions of temperature ($22\pm 1^\circ\text{C}$) and humidity ($50\pm 10\%$) and with 12-h light-dark cycle of light and darkness, in accordance with the pre-established parameters for this species. The diet used (Letica, IPM-R20) contained all the nutrients these animals need, with the exception of sodium, in order to avoid inducing

cepção de sódio, de modo a prevenir a indução de HTA pela dieta. Antes de iniciar as experiências, aquando da sua chegada ao laboratório, os animais foram aclimatizados durante uma semana e o peso dos animais foi avaliado semanalmente, sempre no mesmo horário.

2. Tratamento com CsA

Os ratos foram marcados, pesados e divididos por gaiolas apropriadas de acordo com o grupo de tratamento, constando para cada animal uma folha de registo com os dados individuais e evolução durante o tratamento. Todos os animais foram observados diariamente de modo a detectar ou acompanhar possíveis patologias associadas, ou não, ao tratamento. A CsA (Sandimmun Neoral[®]) foi administrada oralmente com a ajuda de uma cânula esofágica, diariamente (entre as 19 e as 20 h), nas doses de 5 ou 30 mg/Kg e por um período de 7 semanas. A CsA foi diluída em sumo de laranja e administrada num volume de 0,5 ml/rato. Ao grupo controlo foi administrado sumo de laranja nas mesmas condições e volume da CsA. Os níveis sanguíneos médios do fármaco foram determinados no Instituto de Imunologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, por método padronizado para o efeito e de uso corrente no controlo hospitalar (TDxFLx - Cyclosporin Monoclonal Whole Blood - Sandoz, Basel, Switzerland). Em todas as séries (e periodicamente) de forma aleatória foram controlados os valores de ciclosporinémia sempre às 14 horas após a toma do fármaco. Porém, sempre que terminámos uma série e após a última toma do fármaco foram colhidas amostras às 14 e 36 horas para determinação do referido parâmetro. Nesta fase não houve mais administração do fármaco e os ratos foram sacrificados para posteriores estudos vasculares e anatomopatológicos.

Nestes estudos foram utilizadas diferentes séries de animais. A pressão arterial e o peso corporal foram avaliados em todos os animais em estudos. Os restantes parâmetros foram estudados em diferentes séries.

3. Determinação dos parâmetros bioquímicos

Para proceder às colheitas de sangue, os ratos foram anestesiados com cetamina (Ketalar[®], Parke-Davis, 50 mg/ml) + clorpromazina (Largactil[®], Rhône-Poulenc, 0.5 %). A mistura, contendo 2 volumes de Ketalar[®] e 1 volume de

hypertension through the diet. On their arrival at the laboratory, the animals were acclimatized for a week before the beginning of the experiments, and their weight was measured weekly, always at the same time of day.

2. Treatment with cyclosporin

The rats were marked, weighed and divided among the appropriate cages according to their treatment group, with a record card for each animal showing individual details and evolution during treatment. All the animals were observed daily to detect and monitor any possible pathologies associated with the treatment or not. Cyclosporin (Sandimmune Neoral[®]) was administered orally with the help of an esophageal cannula, daily between 19 and 20 h, in doses of 5 or 30 mg/kg over a period of 7 weeks. It was diluted in orange juice and administered at a volume of 0.5 ml/rat. The control group was given orange juice only under the same conditions and volume as those receiving cyclosporin. Mean blood levels of the drug were determined at the Institute of Immunology of the Faculty of Medicine of Coimbra University, using a standardized method in common use in hospitals for this purpose (TDxFLx - Cyclosporin Monoclonal Whole Blood - Sandoz, Basel, Switzerland). Randomly, in all series (and periodically), the values of blood cyclosporin levels were checked, in each case 14 hours after the drug was administered. However, whenever a series was completed and after the last dose of the drug, samples were taken at 14 and 36 hours to determine this parameter. At this stage the drug was not administered again and the rats were sacrificed for subsequent vascular and pathological studies.

Different series of animals were used in these studies. Blood pressure and body weight were assessed in all the animals under study. The other parameters were studied in different series.

3. Determination of biochemical parameters

For collection of blood samples, the rats were anesthetized with ketamine (Ketalar[®], Parke-Davis, 50 mg/ml) + chlorpromazine (Largactil[®], Rhône-Poulenc, 0.5 %). The mixture, containing two volumes of Ketalar[®] and 1 volume of Largactil[®], was injected intraperitoneally in a dose of 2 ml/kg. The blood, be-

Largactil[®], foi injectada i.p. numa dose de 2 ml/Kg. O sangue (entre 2 a 5 ml) foi colhido da veia jugular direita com uma agulha heparinizada. O anticoagulante, neste caso específico EDTA, foi colocado na seringa. Seguidamente o sangue foi cuidadosamente colocado em tubos de polipropileno para análise posterior. Nos ratos em tratamento (controlo e CsA) foram determinados os seguintes parâmetros bioquímicos, por métodos padronizados para a clínica humana: colesterol total, triglicérides, colesterol HDL, creatinina, aspartato-amino-transferase (SGOT), alanina-amino-transferase (SGPT), ião sódio, ião potássio, CPK e LDH.

4. Determinação da concentração de proteínas na urina

Os ratos foram colocados em gaiolas metabólicas individuais, com livre acesso à água e à comida. Após dois dias de adaptação, recolheram-se amostras de urina durante 24 horas. A urina foi recolhida sem contaminação de comida ou fezes, em recipientes graduados contendo 1 ml de azeite mineral, para evitar a evaporação e 10 µg/ml de azida sódica, como agente antimicrobiano. A seguir, a urina foi centrifugada a 4°C, durante 15 minutos, a 1000 xg. Recolheram-se alíquotas de 1 ml e congelaram-se a -20°C. A quantidade de proteínas na urina foi determinada pelo método de Bradford⁽¹⁵⁾.

5. Medição da pressão arterial

A medição da pressão arterial foi efectuada pelo método oscilométrico na cauda do rato (*tail cuff*), utilizando um equipamento LE 5001 (Letica), em animais conscientes. À chegada ao laboratório, e após um período de adaptação ao meio, mediram-se as pressões arteriais durante um período de duas semanas de forma a habituar os animais ao sistema de medição, conseguindo-se assim um maior rigor e homogeneidade dos valores obtidos. Para cada valor de pressão arterial foram sempre efectuadas um mínimo de 10 medições a cada animal e utilizada a média resultante. A pressão arterial foi controlada semanalmente durante todo o período de tratamento e em todos os animais em estudo.

6. Avaliação cardíaca (electrocardiograma)

O electrocardiograma foi efectuado em todos os animais de uma mesma série no final de

tween 2 and 5 ml, was collected from the right jugular vein with a heparinized needle. An anticoagulant, in this case EDTA, was placed in the syringe. The blood was then carefully placed in polypropylene tubes for later analysis. In the rats being treated (control and cyclosporin), the following biochemical parameters were measured, by standard methods used in human clinical practice: total cholesterol, triglycerides, HDL cholesterol, creatinine, serum glutamic-oxaloacetic transaminase (SGOT), serum glutamic-pyruvic transaminase (SGPT), sodium ions, potassium ions, creatine phosphokinase (CPK) and lactic dehydrogenase (LDH).

4. Determination of protein concentration in urine

The rats were placed in individual metabolic cages with free access to food and water. After two days' adaptation, urine samples were taken over a period of 24 hours. The urine was collected without contamination by food or feces, in graduated receptacles containing 1 ml of mineral oil to prevent evaporation and 10 µg/ml of sodium azide as an antimicrobial agent. The urine was then centrifuged at 4°C for 15 minutes at 1000 xg. Aliquots of 1 ml were collected and frozen at -20°C. The quantity of proteins in the urine was determined by Bradford's method⁽¹⁵⁾.

5. Measurement of arterial blood pressure

Arterial blood pressure was measured by the oscillometric method on the rat's tail (*tail cuff*), using an LE 5001 device (Letica) on conscious animals. On arrival at the laboratory, and after a period of adaptation to the environment, arterial blood pressures were measured over a period of two weeks in order to accustom the animals to the measurement technique, thus obtaining greater rigor and homogeneity in the values obtained. For each value of arterial pressure 10 measurements were taken in each animal and the resulting mean was used. Arterial pressure was checked weekly during the entire treatment period and in all the animals being treated.

6. Cardiac assessment (electrocardiogram)

An electrocardiogram was performed in all animals of a particular series at the end of 7

7 semanas de tratamento. Para tal, os ratos foram anestesiados com 30 mg/Kg de pentobarbital sódico por via intraperitoneal. Utilizou-se um electrocardiógrafo «LOGOS 21», com uma sensibilidade de 2 mV e uma velocidade de registo de 50 mm/min. O pêlo na zona de contacto dos eléctrodos (1 cm² na face interna dos membros anteriores e posteriores) foi cuidadosamente cortado e aplicado o gel de contacto. Uma vez colocados os eléctrodos, registaram-se as três derivações clássicas (I, II e III) e as derivações aVR, aVL e aVF. A dificuldade de contagem dos espaços intercostais levou a que as derivações pré-cordiais não fossem efectuadas. Para efeitos de quantificação dos intervalos e amplitudes das ondas, foram consideradas as derivações II, III e AVF.

7. Avaliação estatística

Foi aplicado o teste de Fisher's PLSD (*protected least significant difference*) obtido pela análise de variância (ANOVA). Os níveis de probabilidade inferiores a 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

RESULTADOS

Os resultados obtidos relativamente à ciclosporinémia nos ratos confirmaram os supostos de que as concentrações médias em vale se assemelhavam às concentrações das doses terapêuticas humanas, isto é, para a dose de 30 mg/Kg/dia a concentração sanguínea era de $\sim 10^{-6}$ M, enquanto que a concentração média em vale para a dose de 5 mg/Kg/dia era de $\sim 10^{-7}$ M (*Tabela I*). No rato torna-se impossível determinar com exactidão o valor de C_{max}, visto as concentrações sanguíneas atingidas serem mais altas do que em humanos. Por este motivo procuraram-se tempos de experiência em que as concentrações sanguíneas fossem equivalentes no homem ao valor de C_{max} e C_{min}. Assim, e de acordo com as considerações feitas anteriormente, foi utilizado como tempo de experiência as 14 ou 36 horas após a última administração do fármaco (no final do tratamento).

As alterações dos lipídeos plasmáticos, nomeadamente o aumento dos níveis de colesterol total e triglicérides e baixa dos níveis de colesterol HDL, são actualmente um dos principais factores de risco para o desenvolvimento de lesões vasculares bem como o desenvolvimento de HTA. Para o grupo tratado com 30 mg/Kg/dia não se registaram diferenças nos

weeks of treatment. The rats were anesthetized with 30 mg/kg of sodium pentobarbital intraperitoneally. A Logos 21 electrocardiograph was used with a sensitivity of 2 mV and a speed of 50 mm/min. The skin in the area of contact with the electrodes (1 cm² on the inner side of the front and hind limbs) was carefully shaved and contact gel was applied. When the electrodes were in place, the three classical leads (I, II and III) and the aVR, aVL and aVF leads were recorded. Difficulty in counting intercostal spaces meant that the precordial leads were not used. To quantify the intervals and amplitudes of the waves, the II, III and aVF leads were used.

7. Statistical assessment

The Fisher's PLSD (protected least significant difference) test was applied, obtained by analysis of variance (ANOVA). Probability levels lower than 0.05 were considered statistically significant.

RESULTS

The results obtained for blood cyclosporin levels in the rats confirmed the assumption that mean trough concentrations would be similar to the concentrations found for human therapeutic doses, that is for the 30/mg/kg/day dose the blood concentration was $\sim 10^{-6}$ M, while for the 5 mg/kg/day it was $\sim 10^{-7}$ M (*Table I*). In the rat it is impossible to determine the precise value of C_{max}, as the blood concentrations attained are higher than in humans. For this reason experimental times were sought in which the blood concentrations would be equivalent in humans to the value of C_{max} and C_{min}. Thus, and in accordance with the considerations outlined above, experimental times were used of 14 and 36 hours after the last administration of the drug at the end of the treatment.

Table I
Blood cyclosporin levels in Wistar rats treated for 7 weeks with 5 and 30 mg/kg/day of oral cyclosporin. Cyclosporin levels were determined in whole blood in randomly selected animals from each group. The values are means±standard error (n=4)

Dose administered (mg/kg/day)	Blood concentrations at 14 hours (µM)	Blood concentration at 36 hours (µM)
5	0.440±0.017	0.050±0.001
30	1.760±0.060	0.430±0.110

teores plasmáticos de lipídeos quando comparados com o grupo controle. Todavia, nos animais tratados com a dose mais baixa verificaram-se alterações significativas nos níveis de lipídeos plasmáticos: aumento de colesterol total e do colesterol HDL (*Tabela II*), sem, no entanto, ultrapassar os padrões de normalidade.

Tabela I

Valores de ciclosporinemia de ratos Wistar tratados durante 7 semanas com 5 e 30 mg/Kg/dia de CsA, por via oral. As determinações de CsA foram feitas em sangue total em animais escolhidos aleatoriamente entre cada grupo. Os valores representam médias±erro padrão (n=4)

Dose Administrada (mg/Kg/dia)	Concentração Sanguínea às 14 horas (µM)	Concentração Sanguínea às 36 horas (µM)
5	0,440±0,017	0,050±0,001
30	1,760±0,060	0,430±0,110

Tabela II

Concentração plasmática de lipídeos nos ratos Wistar tratados com CsA durante 7 semanas nas doses de 5 e 30 mg/Kg/dia. Os valores representam médias±erro padrão.

n=6 (cada grupo)	Controlo	Ciclosporina 5 mg/Kg/dia	Ciclosporina 30 mg/Kg/dia
Colesterol Total (mmol/L)	1,30±0,07	1,54±0,06 *	1,47±0,06
Triglicérides (mmol/L)	1,17±0,26	0,97±0,19	0,99±0,05
Colesterol HDL (mmol/L)	0,99±0,10	1,25±0,05 *#	0,94±0,12

* p<0,05 (ANOVA) em relação ao controlo;

p<0,05 relativamente ao grupo tratado com 30 mg/Kg/dia de CsA.

As variações de peso encontradas ao longo das 7 semanas de tratamento não foram proporcionais aos níveis de lipídeos plasmáticos, uma vez que o não aumento de peso corporal, contrariamente ao aumento de colesterol, se mostrou dependente da dose utilizada (*Tabela III*). Tendo em conta que os animais em estudo eram adultos jovens, o grupo controle, durante o tratamento, teve um aumento de cerca de 50 g no seu peso corporal. No entanto, o grupo tratado com 5 mg/Kg/dia aumentou apenas 10,8 g. O efeito no peso corporal do grupo tratado com 30 mg/Kg/dia foi ainda mais acentuado, não havendo qualquer alteração até ao final das 7 semanas (*Tabela III*).

Tal como está descrito na terapêutica humana, e tal como seria de esperar, o tratamento com CsA induziu aumentos da pressão arterial no rato muito rapidamente, logo após 2 semanas de administração do fármaco. Ambas as

Changes in plasma lipids, particularly increased levels of total cholesterol and triglycerides and reduction in HDL cholesterol levels, are nowadays one of the main risk factors for the development of vascular lesions as well as the development of hypertension. In the group treated with 30 mg/kg/day no differences in plasma lipid levels were detected compared to the control group. However, in the animals treated with the lower dose there were significant changes in plasma lipids, with increased total cholesterol and HDL cholesterol (*Table II*), although without exceeding normal values.

Table II

Plasma concentrations of lipids in Wistar rats treated for 7 weeks with cyclosporin at doses of 5 and 30 mg/kg/day. The values are means±standard error

n=6 (each group)	Control	Cyclosporin 5 mg/kg/day	Cyclosporin 30 mg/kg/day
Total cholesterol (mmol/L)	1.30±0.07	1.54±0.06 *	1.47±0.06
Triglycerides (mmol/L)	1.17±0.26	0.97±0.19	0.99±0.05
HDL Cholesterol (mmol/L)	0.99±0.10	1.25±0.05 *#	0.94±0.12

* p<0.05 (ANOVA) in relation to control;

p<0.05 in relation to the group with 30 mg/Kg/dia of cyclosporin.

The variations in weight found over the 7 weeks of treatment were not proportional to plasma lipid levels, since the failure of body weight to increase, despite the increase in cholesterol, was shown to be dependent on the dose used (*Table III*). Bearing in mind that the animals used in the study were young adults, the control group increased their body weight by around 50 g during the treatment. However, the group treated with 5 mg/kg/day increased by only 10.8 g. The effect on body weight was even more pronounced in the group treated with 30 mg/kg/day, with no change at the end of the 7 weeks (*Table III*).

Table III

Evolution of body weight of Wistar rats treated for 7 weeks with cyclosporin at doses of 5 and 30 mg/kg/day. The values are means of weight (in grams)±standard errors, n=30 for each group. The variation in relation to the control group (Δ) after the same treatment time is also shown.

Treatment time	Control	Cyclosporin 5 mg/kg/day	Cyclosporin 30 mg/kg/day
Week 0	356.20±17.39	380.60±15.03	323.00±30.00
Week 7	404.60±17.95*	391.40±9.86	325.00±30.00
Δ	+48.40	+10.80	+2.00

*p<0.05 in relation to time 0.

doses registaram um aumento da pressão arterial sistólica, diastólica e média (*Tabela IV*).

Tabela III

Evolução do peso corporal dos ratos Wistar tratados com CsA durante 7 semanas nas doses de 5 e 30 mg/Kg/dia. Os valores representam médias dos pesos (em gramas) \pm erro padrão - n=30 para cada um dos grupos. É também indicada a variação em relação ao controle (Δ) após o mesmo tempo de tratamento.

Tempo de Tratamento	Controlo	Ciclosporina 5 mg/Kg/dia	Ciclosporina 30 mg/Kg/dia
Semana 0	356,20 \pm 17,39	380,60 \pm 15,03	323,00 \pm 30,00
Semana 7	404,60 \pm 17,95*	391,40 \pm 9,86	325,00 \pm 30,00
Δ	+48,40	+10,80	+2,00

*p<0,05 em relação ao tempo 0.

Tabela IV

Valores de pressão arterial (P) (mmHg) e frequência cardíaca (bpm), de ratos Wistar, após 7 semanas de tratamento com 5 e 30 mg/Kg/dia de ciclosporina. As medições foram feitas em ratos não anestesiados. Os valores representam médias \pm erro padrão (n=30)

	Controlo	Ciclosporina 5 mg/Kg/dia	Ciclosporina 30 mg/Kg/dia
P. Sistólica	164 \pm 1	189 \pm 3*	178 \pm 1*#
P. Diastólica	103 \pm 1	114 \pm 2*	112 \pm 1*
P. Média	120 \pm 3	136 \pm 4*	134 \pm 1*
Freq. Cardíaca	316 \pm 4	320 \pm 5	407 \pm 6*#
P. Diferencial	61,1 \pm 0,7	75,5 \pm 0,9*	65,2 \pm 2,3*#

* p<0,05 (ANOVA) em relação ao controlo;

p<0,05 relativamente ao grupo tratado com 5 mg/Kg/dia de CsA.

De realçar também o importante facto de, para a dose de 30 mg/Kg/dia, se ter verificado um aumento da frequência cardíaca (*Tabela IV*). Também a pressão arterial diferencial se mostrou aumentada para o grupo de ratos tratados com 5 mg/Kg/dia, podendo sugerir uma menor distensibilidade arterial.

Da análise dos registos electrocardiográficos dos três grupos de animais em estudo pode observar-se que todas as alterações foram dependentes da dose utilizada. Isto é, as mais significativas foram registadas no grupo de animais tratados com 30 mg/Kg/dia de CsA. As alterações resumiram-se a aumentos do intervalo QT e QTC para os dois grupos com CsA e ao aumento da amplitude da onda T para o grupo com a dose mais elevada (*Tabela V*). De notar ainda que nos animais tratados com 30 mg/Kg/dia foi registada uma diminuição da amplitude do complexo RS (hRS), bem como um supradesnívelamento do segmento ST, que incluía a onda T (hST). Ao contrário do que se

As described in human therapy, and as is to be expected, treatment with cyclosporin led to a rapid increase in blood pressure in the rat, after only 2 weeks' administration of the drug. Increases in systolic, diastolic and mean blood pressure were recorded for both dosages (*Table IV*).

Table IV

Blood pressure (P) (mmHg) and heart rates (bpm) of Wistar rats after 7 weeks of treatment with 5 and 30 mg/kg/day of cyclosporin. The measurements were made on non-anesthetized rats. The values are means \pm standard error (n=30)

	Control	Cyclosporin 5 mg/kg/day	Cyclosporin 30 mg/kg/day
Systolic P.	164 \pm 1	189 \pm 3*	178 \pm 1*#
Diastolic P.	103 \pm 1	114 \pm 2*	112 \pm 1*
Mean P.	120 \pm 3	136 \pm 4*	134 \pm 1*
Heart rate	316 \pm 4	320 \pm 5	407 \pm 6*#
Differential P.	61.1 \pm 0.7	75.5 \pm 0.9*	65.2 \pm 2.3*#

* p<0.05 (ANOVA) in relation to control;

p<0.05 relative to the group treated with 5 mg/kg/day of cyclosporin.

It is also significant that, for the 30 mg/kg/day dose, an increase in heart rate was found (*Table IV*). Differential blood pressure was also seen to increase for the group of rats treated with 5 mg/kg/day, which may indicate a reduction in arterial distensibility.

An analysis of the electrocardiographic records of the three groups of animals under study shows that all the changes were dependent on the dose used, the most significant ones being recorded in the group treated with 30 mg/kg/day of cyclosporin. The changes can be summarized as increases in the QT and QTc interval for the two groups treated with cyclosporin and an increase in amplitude of the T wave for the group receiving the higher dosage (*Table V*). It should also be noted that in the animals treated with 30 mg/kg/day a reduction in the amplitude of the RS complex (hRS) was recorded, as well as ST segment elevation, which included the T wave (hST). In contrast to what was observed in conscious animals, there were no changes in heart rate of anesthetized animals (sodium pento barbital, 30 mg/kg). Furthermore, and only in the group treated with 30 mg/kg/day, these electrocardiographic alterations were accompanied by rises in enzyme levels, particularly of SGOT and CPK (*Table VI*). However, LDH values remained normal compared to the control group. Despite the cardiac alterations described, none of them led to changes in ventricular mass, as

observou nos animais conscientes, com os animais sob o efeito de anestesia (pentobarbital sódico – 30 mg/Kg) não há qualquer alteração na frequência cardíaca. Também, e apenas no grupo tratado com 30 mg/Kg/dia, estas alterações electrocardiográficas foram acompanhadas por elevação enzimática, nomeadamente nos níveis de SGOT e CPK (Tabela VI). No entanto, os valores de LDH mantiveram-se normais relativamente ao grupo controlo. Apesar das alterações cardíacas referidas, nenhuma delas contribuiu para a modificação da massa ventricular, já que não houve variação significativa no dos ventrículos.

Tabela V

Parâmetros electrocardiográficos dos ratos Wistar tratados com 5 e 30 mg/Kg/dia de CsA durante 7 semanas. Os valores representam médias ± erro padrão. Foram avaliados os seguintes parâmetros: Frequência cardíaca, hRS (amplitude da onda R e S), €P (amplitude da onda P), PR (duração entre o início de P até Q ou R), QRS (intervalo QRS), QT (intervalo do complexo QT), QTc (amplitude do complexo QT corrigido pela expressão de Bazett) e hT (amplitude da onda T). Os animais estavam sob anestesia com pentobarbital.

	Controlo (n=8)	Ciclosporina 5 mg/Kg/dia (n=10)	Ciclosporina 30 mg/Kg/dia (n=8)
Freq. Cardíaca (bat./min.)	444,0±15,0	400,0±25,3	432,0±12,0
h RS (mV)	0,686±0,075	0,561±0,048	0,500±0,032*
€ P (mseg)	27,5±2,0	26,7±2,2	28,0±2,0
PR (mseg)	55,0±2,9	48,3±3,1	54,0±4,0
QRS (mseg)	20,0	20,0	20,0
QT (mseg)	57,5±2,5	76,7±4,2*	86,0±4,0*#
QTc (mseg)	161,2±4,6	206,1±15,3*	240,8±10,4*#
h T (mV)	0,142±0,025	0,213±0,030	0,270±0,037*

* p<0,05 (ANOVA) em relação ao controlo;

p<0,05 relativamente ao grupo tratado com 5 mg/Kg/dia de CsA.

Tabela VI

Valores plasmáticos de aspartato aminotransferase (SGOT), creatina fosfoquinase (CPK) e desidrogenase láctica (LDH) de ratos Wistar tratados com 5 e 30 mg/Kg/dia de CsA durante 7 semanas e respectivo grupo controlo. Os valores representam médias±erros padrão

	Controlo (n=8)	Ciclosporina 5 mg/Kg/dia (n=10)	Ciclosporina 30 mg/Kg/dia (n=8)
SGOT (U/L)	62,75±4,67	68,91±12,16	118,29±23,57*#
SGPT (U/L)	26,80±2,13	86,00±21,85	47,50±8,96*#
CPK (U/L)	90,82±28,10	93,41±17,58	183,84±45,92*#
LDH (U)	285,43±94,81	269,93±45,65	234,20±60,60

* p<0,05 em relação ao controlo;

p<0,05 relativamente ao grupo tratado com 5 mg/Kg/dia de CsA.

Tal como foi descrito, os tratamentos com CsA induzem, para além de HTA, nefrotóxic-

there was no significant variation in the weight of the ventricular mass.

Table V

Electrocardiographic parameters of Wistar rats treated for 7 weeks with cyclosporin at doses of 5 and 30 mg/kg/day. The values are mean±standard error. The following parameters were assessed: heart rate, hRS (amplitude of R and S waves) €P (amplitude of P wave), PR (duration between the beginning of P until Q or R), QRS (QRS interval), QT (QT complex interval), QTc (amplitude of the QT complex corrected by Bazett's formula), and hT (amplitude of T wave). The animals were anesthetized with pentobarbital.

	Control (n=8)	Cyclosporin 5 mg/kg/day (n=10)	Cyclosporin 30 mg/kg/day (n=8)
Heart rate (bat./min.)	444.0±15.0	400.0±25.3	432.0±12.0
h RS (mV)	0.686±0.075	0.561±0.048	0.500±0.032*
€ P (msec)	27.5±2.0	26.7±2.2	28.0±2.0
PR (msec)	55.0±2.9	48.3±3.1	54.0±4.0
QRS (msec)	20.0	20.0	20.0
QT (msec)	57.5±2.5	76.7±4.2*	86.0±4.0*#
QTc (msec)	161.2±4.6	206.1±15.3*	240.8±10.4*#
h T (mV)	0.142±0.025	0.213±0.030	0.270±0.037*

* p<0.05 (ANOVA) in relation to control;

p<0.05 relative to the group treated with 5 mg/kg/day of cyclosporin.

Table VI

Plasma levels of serum glutamic-oxaloacetic transaminase (SGOT), creatine phosphokinase (CPK) and lactic dehydrogenase (LDH) in Wistar rats treated for 7 weeks at doses of 5 and 30 mg/kg/day of cyclosporin and the respective control group. The values are means±standard error.

	Control (n=8)	Cyclosporin 5 mg/kg/day (n=10)	Cyclosporin 30 mg/kg/day (n=8)
SGOT (U/L)	62.75±4.67	68.91±12.16	118.29±23.57*#
SGPT (U/L)	26.80±2.13	86.00±21.85	47.50±8.96*#
CPK (U/L)	90.82±28.10	93.41±17.58	183.84±45.92*#
LDH (U)	285.43±94.81	269.93±45.65	234.20±60.60

* p<0.05 (ANOVA) in relation to control;

p<0.05 relative to the group treated with 5 mg/kg/day of cyclosporin.

As has been described, treatment with cyclosporin induces nephrotoxicity as well as hypertension. For this reason it has also been suggested that the development of nephrotoxicity may underlie the appearance of hypertension. It was thus necessary to discover to what extent renal lesions occur prior to vascular lesions, and how they may contribute towards inducing hypertension.

We began by studying the effect of cyclosporin on parameters associated with renal function, such as levels of serum creatinine, serum Na⁺ and K⁺ ions, and proteinuria. None

dade. Por isso tem sido igualmente sugerido que o desenvolvimento de nefrotoxicidade possa estar subjacente ao aparecimento de HTA. Tornou-se então necessário averiguar até que ponto as lesões renais são anteriores à lesão vascular e qual a sua possível contribuição para a indução de HTA.

Começou por se estudar a interferência da CsA em parâmetros associados à funcionalidade renal como sejam: os níveis de creatinina sérica, dos iões Na^+ e K^+ no soro, bem como dos níveis de proteinúria. Nenhum dos valores encontrados diferiu significativamente do grupo controlo (*Tabela VII*), o que parece sugerir que, nas doses e tempo utilizados, o rim não foi funcionalmente afectado pelo tratamento com CsA, pelo menos em relação aos parâmetros medidos. De notar o facto de os valores de creatinina plasmática, coincidentemente, terem sido iguais em todos os animais normais, resultando daí uma ausência de desvio padrão.

Tabela VII

Valores séricos de creatinina, Na^+ e K^+ e valores urinários de proteína em ratos normais (controlo) e tratados com 5 ou 30 mg/Kg/dia de CsA durante 7 semanas. Os valores representam médias±erros padrão

Parâmetros	Controlo (n=8)	Ciclosporina 5 mg/Kg/dia (n=6)	Ciclosporina 30 mg/Kg/dia (n=6)
Creatinina ($\mu\text{mol/L}$)	44,20±0,00	44,20±3,62	51,50±2,74
Na^+ (mEq/L)	132,40±4,49	132,83±1,222	131,75±2,926
K^+ (mEq/L)	4,92±0,24	5,03±0,32	5,78±0,26
Proteinúria (mg prot./dia)	3,15±0,19	3,19±0,27	3,20±0,51

DISCUSSÃO

Da análise da janela terapêutica da CsA em doentes transplantados⁽¹⁶⁾, bem como da análise das curvas de biodisponibilidade^(17, 18), pode concluir-se o seguinte: a concentração máxima do fármaco no sangue total é de 1,4 a 2,7 ng/ml e no plasma de 1 ng/ml por cada mg de CsA administrado. Calculando para um indivíduo de 70 Kg de peso, os valores médios atingidos variam entre 5×10^{-7} e $1,5 \times 10^{-6}$ M, para uma dose mínima de 3 mg/Kg/dia e uma máxima de 10 mg/Kg/dia. Desta forma, as concentrações irão situar-se entre os 10^{-7} e 10^{-6} M. O facto de os valores sanguíneos médios atingirem o valor superior de $8,30 \times 10^{-7}$ M foi já anteriormente descrita por Nashan et al. em 1988⁽¹⁹⁾. As doses a aplicar no animal foram

of the values found differed significantly from the control group (*Table VII*), which seems to suggest that, at the doses and timings used, the kidney was not functionally affected by the cyclosporin treatment, at least in terms of the parameters measured. It should be noted that, by coincidence, the plasma creatinine values were identical in all the normal animals, resulting in the absence of a standard deviation.

Table VII

Serum levels of creatine, Na^+ and K^+ and urine protein levels in normal rats (control) and those treated for 7 weeks with 5 or 30 mg/kg/day of cyclosporin. The values are means±standard error.

Parameters	Control (n=8)	Cyclosporin 5 mg/kg/day (n=6)	Cyclosporin 30 mg/kg/day (n=6)
Creatinine ($\mu\text{mol/L}$)	44.20±0.00	44.20±3.62	51.50±2.74
Na^+ (mEq/L)	132.40±4.49	132.83±1.222	131.75±2.926
K^+ (mEq/L)	4.92±0.24	5.03±0.32	5.78±0.26
Proteinuria (mg prot./day)	3.15±0.19	3.19±0.27	3.20±0.51

DISCUSSION

From the analysis of the “therapeutic window” of cyclosporin in transplant patients⁽¹⁶⁾, as well as of the bioavailability curve^(17, 18), it can be concluded that the maximum concentration of the drug in whole blood is 1.4 to 2.7 ng/ml and 1 ng/ml in plasma for each mg of cyclosporin administered. For an individual weighing 70 kg, the mean values attained vary between 5×10^{-7} and 1.5×10^{-6} M, for a minimum dose of 3 mg/kg/day and a maximum of 10 mg/kg/day. Concentrations will therefore range between 10^{-7} and 10^{-6} M. The fact that mean blood levels may reach a higher value of 8.30×10^{-7} M was reported by Nashan et al. in 1988⁽¹⁹⁾. The doses to be used in the animals were chosen on the basis of human pharmacokinetic curves. The 5 mg/kg/day dose thus corresponds to a plasma concentration of 10^{-7} M (trough concentration – C_{min} in humans) and the 30 mg/kg/day dose to an approximate concentration of 10^{-6} M (peak concentration – C_{max} in humans).

The increase in blood pressure associated with cyclosporin treatment has been described not only in transplant patients but also in healthy volunteers⁽²⁰⁾. At the same time, hypertension has been successfully reproduced in animal models receiving acute and chronic treatment with cyclosporin. However, the results

escolhidas tendo como base as curvas farmacocinéticas humanas. Deste modo, a dose de 5 mg/Kg/dia corresponde a uma concentração plasmática de 10^{-7} M (concentração de vale – Cmin no homem) e a dose de 30 mg/Kg/dia a uma concentração aproximada de 10^{-6} M (concentração de pico – Cmax no homem).

O aumento da pressão arterial associado ao tratamento com CsA não está descrito apenas em doentes transplantados mas também em voluntários sãos⁽²⁰⁾. Por outro lado, a HTA tem sido reproduzida com sucesso em modelos animais tratados com CsA de forma aguda ou crónica. No entanto, os resultados obtidos são inconsistentes, tendo sido descritos aumento^(21, 22, 23, 24, 25), diminuição⁽²⁶⁾ ou mesmo nenhuma alteração^(27, 28, 29, 30). Tal dever-se-á, muito provavelmente, ao facto de que entre os trabalhos referidos não haver homogeneidade ou repetição das condições experimentais, variando quer a dose de CsA, o seu veículo, o tempo de tratamento ou a estirpe de ratos, quer até o método de avaliação da pressão arterial. Em função disso, também não tem sido possível encontrar qualquer tipo de correlação de causalidade entre as doses e os níveis de pressão arterial determinados. Nesse domínio, os nossos resultados estão de acordo com os encontrados por Gerkens et al.⁽²¹⁾ e Golub et al.⁽²²⁾. Isto é, uma dose mais baixa (5 mg/Kg/dia) induziu um aumento dos valores tensionais de magnitude semelhante a uma dose mais elevada (20 mg/Kg/dia), mas evoluindo mais rapidamente e sendo evidente um estado de HTA mantida logo após a primeira semana de tratamento.

Na literatura disponível apenas num trabalho se encontra referência a alterações na frequência cardíaca durante e após tratamento com CsA⁽²¹⁾. Aí se observa que o tratamento durante 3 semanas com 5, 10 e 20 mg/Kg aumenta a frequência cardíaca do rato. No entanto, foi com a dose de 20 mg/Kg que se verificou o aumento mais acentuado, o que está de acordo com os resultados por nós encontrados. Mesmo em relação ao comportamento da pressão arterial, nos dois trabalhos que apresentam algum paralelismo com os nossos resultados a dose de 20 mg/Kg leva a resultados equivalentes aos por nós encontrados para a dose de 30 mg/Kg.

O nosso trabalho revelou um diferente comportamento das duas doses de CsA testadas, em relação aos valores de pressão arterial. Apesar de ambas induzirem HTA, parece ser por diferentes motivos. Assim, para a dose de

obtained are inconsistent, showing increases^(21, 22, 23, 24, 25), reduction⁽²⁶⁾ or even no change^(27, 28, 29, 30).

This is most probably due to the lack of homogeneity or replication of experimental conditions between the studies, with variations in the dose of cyclosporin, the vehicle used, treatment time and the strain of rat, and even the method of measuring blood pressure. As a result, it was also not possible to find any causal correlation between dosages and the blood pressure levels determined. In this context, our results are in accordance with those of Gerkens et al.⁽²¹⁾ and Golub et al.⁽²²⁾: a lower dose (5 mg/kg/day) induced an increase in blood pressure of a similar magnitude to a higher dose (20 mg/kg/day), but with a more rapid development and with a state of sustained hypertension being evident after the first week of treatment.

There is only one work in the literature that refers to changes in heart rate during and after treatment with cyclosporin⁽²¹⁾. In this, it is observed that 3 weeks of treatment with 5, 10 and 20 mg/kg increases heart rate in the rat. However, it was with the 20 mg/kg dose that the largest increase was found, which is in accordance with our results. Even with regard to blood pressure, in the two works that show some similarity to our results, the 20 mg/kg dose leads to comparable results to those we found with the 30 mg/kg dose.

Our study showed different behavior in blood pressure values for the two doses of cyclosporin tested. Although both induced hypertension, the reasons for this would appear to be different. For the 5 mg/kg/day dose, the three parameters (systolic, diastolic and mean blood pressure) rise, although systolic pressure shows a more marked increase. The fact that heart rate does not vary may suggest that the hypertension is the consequence of an increase in systolic volume, in peripheral vascular resistance, or in both. The rise in the second parameter is strengthened by increased differential blood pressure, which also suggests an increase in arterial resistance. With the higher dose of cyclosporin (30 mg/kg/day), the rise in blood pressure may also be a result of increased heart rate, with or without increased peripheral vascular resistance. The rise in heart rate may be associated with cardiac hyperactivity, with or without the presence of tissue (and/or vascular) lesions in the heart. As this hyperactivity develops, such lesions or other abnormalities will arise, and this is why in the

5 mg/Kg/dia os três parâmetros (pressão sistólica, diastólica e média) estão aumentados, embora a pressão sistólica registre uma alteração mais evidente. Como não varia a frequência cardíaca pode sugerir-se que a hipertensão será consequência do aumento do volume sistólico, da resistência vascular periférica ou de ambos. O aumento deste último parâmetro é reforçado pelo aumento da pressão diferencial, sugerindo também um aumento da resistência arterial. No que se refere à dose mais elevada de CsA (30 mg/Kg/dia), o aumento da pressão arterial poderá ter também como causa o aumento da frequência cardíaca, podendo haver, ou não, alteração da resistência vascular periférica. O aumento da frequência cardíaca pode estar associado a uma hiperactividade cardíaca, podendo ou não já haver lesões tecidulares (e/ou vasculares) do coração. Na sua evolução, tais lesões ou alterações surgirão e, assim, é que, a longo prazo, o enfarte do miocárdio é uma das principais causas de morte dos transplantados cardíacos. No modelo experimental aqui utilizado, os animais tratados com 30 mg/Kg/dia apresentaram uma avaliação cardíaca com perfil de cardiopatia isquémica, diagnosticada por avaliação electrocardiográfica e enzimática. Mas, mais do que uma acção directa do fármaco sobre o tecido cardíaco, os resultados obtidos poderão ser uma consequência de um aumento da estimulação cardíaca pelo aumento das catecolaminas circulantes, também comprovado anteriormente no nosso modelo experimental⁽³¹⁾. Como consequência de tal aumento, há de imediato uma captação de catecolaminas e estimulação do tecido cardíaco⁽¹⁶⁾ podendo conduzir a um estado de lesão por morte celular e/ou aumento da proliferação. O facto de se não ter verificado hipertrofia ventricular esquerda pode sugerir que no tecido cardíaco as catecolaminas foram sobretudo responsáveis por indução de necrose (ou outro tipo de morte celular), tal como parece traduzir o aumento das respectivas enzimas SGOT e CPK.

Associado ao aumento da pressão arterial não houve aumento do peso corporal dos animais tratados com CsA ao contrário do que aconteceu com o grupo controlo. Também, Stephan et al.⁽²⁸⁾ em ratos tratados com 50 mg/Kg/dia de CsA não verificaram qualquer alteração no peso corporal, embora também não tenham registado variações da pressão arterial. Todavia, o menor peso corporal foi anteriormente reconhecido como um efeito secundário

long term myocardial infarction is one of the principal causes of death in heart transplant patients. In the experimental model used here, the animals treated with 30 mg/kg/day showed an ischemic heart disease profile, diagnosed by electrocardiography and enzyme levels. However, rather than the direct effect of the drug on the cardiac tissue, the results obtained may be a consequence of an increase in cardiac stimulation through a rise in circulating catecholamines, as previously demonstrated in our experimental model⁽³¹⁾. As a consequence of this rise, there is an immediate uptake of catecholamines and stimulation of cardiac tissue⁽¹⁶⁾, which may lead to a state leading to cell death and/or increase in proliferation. The absence of left ventricular hypertrophy may suggest that the catecholamines were mainly responsible for causing necrosis (or other types of cell death) in the cardiac tissue, as the increases in the enzymes SGOT and CPK would seem to indicate.

Besides the increase in blood pressure, there was no increase in body weight in the animals treated with cyclosporin, in contrast to the control group. Stephan et al.⁽²⁸⁾, in rats treated with 50 mg/kg/day of cyclosporin, also found no change in body weight, although they found no changes in blood pressure either. However, lower body weight had already been acknowledged as a side-effect of cyclosporin in humans as well as in animals^(22, 27, 32, 33). The reason behind this fall in body weight could be a reduction in the quantity of food ingested, metabolic changes as a direct effect of the drug⁽²³⁾, or even atrophy of muscle mass. Reduction in food ingested (not controlled in our study) could not have been the cause, since chronic partial deprivation of food has been shown to be a factor in reducing blood pressure⁽³⁴⁾. Nevertheless, the possibility cannot be excluded that the drug may interfere with the intestinal absorption of certain nutrients that help to regulate blood pressure, such as magnesium and calcium⁽²³⁾. However, no changes in the plasma levels of these ions have been described in any of the studies consulted in the literature. In our opinion, one of the most plausible explanations is atrophy of skeletal muscle caused by cyclosporin. In our experiments this effect was in fact macroscopically visible in both groups, although it was greater in the animals treated with 30 mg/kg/day of cyclosporin. Even the changes in SGOT and SGPT may be related to such muscular atrophy, since they are also found in large quantities in skeletal muscle.

dário da administração de CsA tanto em humanos como em animais ^(22, 27, 32, 33). Na base deste decréscimo de peso corporal poderia estar uma diminuição na quantidade de comida ingerida, alterações metabólicas induzidas por efeito directo do fármaco ⁽²³⁾ ou ainda atrofia da massa muscular. A redução da quantidade de comida ingerida (não controlada no nosso estudo) não terá sido a causa, uma vez que a privação parcial crónica de alimentos foi referida como um factor para a redução da pressão arterial ⁽³⁴⁾. Todavia, não se poderá excluir o facto de o fármaco poder interferir na absorção intestinal de alguns nutrientes com efeitos reguladores da pressão arterial como, por exemplo, o magnésio e o cálcio ⁽²³⁾. No entanto, as alterações plasmáticas destes iões não têm sido referidas em nenhum dos estudos animais consultados na literatura. Na nossa opinião, uma das explicações mais plausíveis será a atrofia da musculatura esquelética causada pela CsA. Na realidade, nas nossas experiências este efeito foi macroscopicamente visível nos dois grupos, embora mais acentuada nos animais tratados com 30 mg/Kg/dia de CsA. As próprias alterações de SGOT e SGPT, poderão ter alguma relação com tal atrofia muscular, uma vez que também no músculo esquelético se encontram em grande quantidade.

A indução de hiperlipidemia foi já associada ao tratamento com CsA por Andrade et al. ⁽³⁵⁾. Mais ainda, as lipoproteínas são um dos pontos de ligação e transporte da CsA no sangue, apesar de não ter sido encontrada correlação entre os níveis de lipídeos séricos e a actividade imunossupressora deste fármaco ⁽³⁶⁾. No presente trabalho apenas se encontraram aumentos do colesterol total e HDL nos ratos tratados com 5 mg/Kg/dia, grupo em que o peso corporal não evoluiu paralelamente com o controlo ao longo do tratamento, resultando numa perda de peso como foi discutido anteriormente neste texto. Tais aumentos, porém, embora estatisticamente significativos em relação aos controlos, não ultrapassaram os chamados valores de normalidade. Mesmo assim, poderão traduzir algum efeito tóxico directo da CsA a nível hepático ⁽³⁷⁾, com conseqüente disfunção deste órgão ⁽³⁸⁾, o que então estaria de acordo com alterações encontradas para os valores das transaminases: as SGOT significativamente elevadas para os animais tratados com 30 mg/Kg/dia, as SGPT elevadas para as duas doses. Curiosamente, os ratos tratados com 5 mg/Kg/dia são os que apresentam os valores de

Treatment with cyclosporin has been associated with hyperlipidemia by Andrade et al. ⁽³⁵⁾. Moreover, lipoproteins are one of the binding and transport points for cyclosporin in the blood, although no correlation has been found between serum lipid levels and the drug's immunosuppressive activity ⁽³⁶⁾. In the present study, increases in total cholesterol and in HDL were found only in rats treated with 5 mg/kg/day, the group in which body weight did not develop in parallel with the control group throughout the treatment, resulting in a relative loss of weight, as discussed above. However, these increases, although statistically significant in comparison with the controls, did not exceed what are considered normal values. Even so, they may be the result of some direct toxic effect of cyclosporin on the liver ⁽³⁷⁾, with consequent liver dysfunction ⁽³⁸⁾, which would be in accordance with the changes found in the values of transaminases: SGOT significantly elevated in the animals treated with 30 mg/kg/day, and SGPT elevated for both doses. Curiously, the rats treated with 5 mg/kg/day present the highest values of SGPT, and this only fails to reach statistical significance due to the high degree of inter-individual variability. Changes in lipid levels may also be associated with changes in lipoprotein lipase (LPL), as found by Lopez-Miranda et al. ⁽³⁸⁾ and Espino et al. ⁽³⁹⁾. The latter demonstrated a correlation between reduction in LPL activity and increases in cholesterol induced by cyclosporin. In contrast to these authors' results, in which the changes described were associated with a reduction in HDL levels, in our study they rose.

Induction of hypertension by cyclosporin has often been explained as a consequence of renal changes, as this drug induces nephrotoxicity ⁽¹²⁾. In the present study, however, the biochemical parameters measured (urine protein and serum creatinine, sodium and potassium) were normal, suggesting that renal function had not been visibly altered. We cannot exclude the possibility that the lesions found might go on to develop into renal failure. Nevertheless, with this treatment time and this renal profile, the cardiovascular system shows anatomical lesions and functional abnormalities of great significance, and which, as far as we can tell, overshadow the slight renal changes encountered. That is to say, in the experimental model under discussion, the cardiovascular abnormalities induced by cyclosporin

SGPT mais elevados, devendo-se a falta de significado estatístico apenas à grande variabilidade interindividual. As alterações lipídicas poderiam também estar associadas a alterações da lipoproteína lipase (LPL), tal como foi encontrado por Lopez-Miranda et al.⁽³⁸⁾ e Espino et al.⁽³⁹⁾. Estes últimos demonstraram uma correlação entre a diminuição da actividade da LPL e os aumentos do colesterol induzidos pela CsA. Contrariamente aos resultados destes autores, em que associado às alterações descritas havia uma diminuição dos níveis de HDL, no nosso trabalho estas aumentam.

A indução de HTA pela CsA foi muitas vezes apontada como consequência de alterações renais, uma vez que este fármaco imunossupressor induz toxicidade renal⁽¹²⁾. No presente estudo, porém, os valores bioquímicos analisados (proteína urinária e creatinina, sódio e potássio séricos) apresentaram-se normais, sugerindo uma função renal ainda sem alterações visíveis. Não podemos excluír o facto das lesões encontradas poderem posteriormente evoluir para uma situação de insuficiência renal. Porém, com este tempo de tratamento e com este perfil renal o sistema cardiovascular apresenta lesões anatómicas e alterações funcionais com grande significado, e ao que tudo indica, se sobrepõe às ligeiras alterações renais encontradas. Isto é, no modelo experimental aqui considerado, as alterações cardiovasculares induzidas pela CsA foram anteriores às alterações renais que eventualmente se viriam a estabelecer se a experiência se prolongasse.

Como última conclusão, poderá ainda dizer-se que o rato Wistar, tratado com doses equivalentes às que condicionam os padrões normais na farmacocinética humana, parece ser um bom modelo experimental para o estudo das alterações induzidas pela ciclosporina, nomeadamente as ocorridas a nível cardiovascular. Consequentemente, um bom modelo para estudar fármacos que previnam e/ou corrijam tais alterações.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a colaboração da Novartis-Farma pela cedência do Sandimmun Neoral[®]. Este trabalho foi financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia, Programa PRAXIS: PRAXIS/PSAU/C/SAU/57/96

were prior to any renal changes that might have developed if the experiment had lasted longer.

As a final conclusion, it may also be said that the Wistar rat, treated with doses equivalent to those considered normal in human pharmacokinetics, appears to be a good experimental model for the study of changes induced by cyclosporin, particularly those occurring at the cardiovascular level, and thus is a good model to study drugs intended to prevent and/or correct such changes.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful for the collaboration of Novartis-Farma in supplying Sandimmun Neoral[®]. This work was financed by the Portuguese Foundation for Science and Technology, Program PRAXIS: PRAXIS/PSAU/C/SAU/57/96.

Pedido de separatas para:
Address for reprints:

FREDERICO TEIXEIRA

Instituto de Farmacologia e Terapêutica Experimental
Faculdade de Medicina – Universidade de Coimbra
3004-504 COIMBRA

Tel: 239 857 777 – Fax: 239 836 200

e-mail: fredjt@ci.uc.pt

BIBLIOGRAFIA / REFERENCES

1. Sander M, Victor RG. Hypertension after cardiac transplantation: pathophysiology and management. *Curr. Opin Nephrol. Hypert* 1995;4:443-51.
2. Bellet M, Cabrol C, Sassano P, Léger P, Corvol P, Ménard J. Systemic hypertension after cardiac transplantation: effect of cyclosporine on the renin-angiotensin-aldosterone system. *Am J Cardiol* 1985;56:927-31.
3. Cohen DJ, Loertscher R, Rubin MF, Tilney NL, Carpenter CB, Strom TB. Cyclosporine. A new immunosuppressive agent for organ transplantation. *Ann Intern Med* 1984;101:667-82.
4. Thompson ME, Shapiro AP, Johnsen AM, Itzkoff JM, Hardesty RL, Griffith BP, Bahnson HT, McDonald RH Jr, Hastillo A, Hess M. The contrasting effects of cyclosporin-A and azathioprine on arterial blood pressure and renal function following cardiac transplantation. *Int. J. Cardiol.* 1986;11:219-29.
5. Myers BD, Ross J, Newton L. Cyclosporine-associated chronic nephropathy *New Engl J Med* 1984;311:699-705.
6. Olivari MT, Antolick A, Ring WS. Arterial hypertension in heart transplant recipients treated with triple-drug immunosuppressive therapy. *J. Heart Transplantation* 1989;8:34-9.
7. First WH, Stinson EB, Oyer PE, Baldwin JC, Shumway NE. Long term hemodynamic results after cardiac transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1987;94:685-93.
8. Angermann CE, Spes CH, Willems S, Dominiak P, Kemkes BM, Theisen K. Regression of left ventricular hypertrophy in hypertensive heart transplant recipients treated with enalapril, furosemide, and verapamil. *Circulation* 1991;84:583-93.
9. Ventura HO, Lavie CJ, Messerli FH, et al. Cardiovascular adaptation to cyclosporine-induced hypertension. *J. Hum. Hypertens.* 1994;8:233-7.
10. Bull DA, Hunter GC, Copeland JG, et al. Peripheral vascular disease in heart transplant recipients. *J Vasc Surg* 1992;16:546-53.
11. Starling RC, Cody RJ. Cardiac transplant hypertension. *Am J Cardiol* 1990;65:106-11.
12. Schachter M. Cyclosporine A and hypertension. *J Hypertension* 1988;6:511-6.
13. Bantle JP, Nath KA, Sutherland DER, Najarian JS, Ferris TF. Effects of cyclosporine on the renin-angiotensin-aldosterone system and potassium excretion in renal transplant recipients. *Arch Intern Med* 1985;145:505-8.
14. Bantle JP, Boudreau FJ, Ferris TF. Suppression of plasma renin by cyclosporine. *Am J Med* 1987;83:59-64.
15. Bradford MM. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-54.
16. Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB, Ruddon RW, Gilman AG. Goodman & Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 9th ed., 1996;52:1298.
17. Kovarik JM, Meller EA, Johnston A, Hitznerberger G, Kutz K. Bioequivalence of soft gelatin capsules and oral solution of a new cyclosporine formulation, *Pharmacotherapy* 1993;13:613-7.
18. Holt DW, Johnston A, Roberts NB, Tredger JM, Trull AK. Methodological and clinical aspects of cyclosporin monitoring. Report of the Association of Clinical Biochemists Task Force, *Ann. Clin Biochem* 1994;31:420-46.
19. Nashan B, Bleck J, Wonigeit K, et al. Effect of the application form of cyclosporine on blood levels: comparison of oral solution and capsules. *Transplant Proc* 1988;20:637-9.
20. Hansen JM, Fogh-Andersen N, Christensen NJ, Strandgaard S. Cyclosporine-induced hypertension and decline in renal function in healthy volunteers. *J Hypertension* 1997;15:319-26.
21. Gerkens JF. Cyclosporine treatment of normal rats produces a rise in blood pressure and decreased renal vascular responses to nerve stimulation, vasoconstrictors and endothelium-dependent dilators. *J Pharmacol Exp Therap* 1989;250:1105-12.
22. Golub MS, Lustig S, Berger ME, Lee BND. Altered vascular responses in cyclosporine-treated rats. *Transplantation* 1989;48:116-8.
23. Rouillet JB, Xue H, McCarron DA, Holcomb S, Bennett WM. Vascular mechanisms of cyclosporin-induced hypertension in the rat. *J Clin Invest* 1994;93:2244-50.
24. Rego A, Vargas R, Suarez KR, Foegh ML, Ramwell PW. Mechanism of cyclosporin potentiation of vasoconstriction of the isolated rat mesenteric arterial bed: Role of extracellular calcium. *J Pharmacol Exp Therap* 1990;254:799-808.
25. Moss GN, 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;82:8222-6.
26. Murray BM, Paller MS, Ferris TF. Effect of cyclosporine administration on renal hemodynamics in conscious rats. *Kidney Int* 1985;28:767-74.
27. Auch-Schwelk W, Bossaller C, Gotze S, Thelen J, Fleck E. Endothelial and vascular smooth muscle function after chronic treatment with cyclosporin A. *J. Cardiovasc. Pharmacol* 1993;21:435-40.
28. Stephan D, Billing A, Krieger JP, et al. Endothelium-dependent relaxation in the isolated rat kidney: impairment by cyclosporine A. *J Cardiovasc Pharmacol* 1995;26:859-68.
29. Garr MD, Paller MS. Cyclosporine augments renal but not systemic vascular reactivity. *Am J Physiol* 1990;258:F211-F217.
30. Textor SC, Smith-Powell L, Telles T. Altered pressor responses to NE and ANG II during cyclosporin A administration to conscious rats. *Am J Physiol* 1990;258:H854-H860.
31. Reis F, Tavares P, Teixeira F. The distribution of catecholamines between plasma and platelet in cyclosporin A-induced hypertensive rats. *Pharmacol Res* 2000;41:129-35.
32. McCauley FT, Whitting PH, Thompson AW, Simpson JG. The influence of enalapril or spironolactone on experimental cyclosporine nephrotoxicity. *Biochem Pharmacol* 1987;36:699-703.
33. Gerkens JF, Bhagwande SB, Dosen PJ, Smith AJ. The effect of salt intake on cyclosporine-induced impairment of renal function in rats. *Transplantation* 1984;84:412-7.
34. Natelson BH, Ottenweller JE, Servatius RJ, Drastal S, Bergen MT, Tapp WN. Effect of stress and food restriction on blood pressure and lifespan of Dahl salt-sensitive rats. *J Hypertension* 1992;10:1457-62.
35. Andrade RJ, Lucena MI, Gonzalez-Correa JA, Garcia-Arias C, Gonzalez-Santos P. Short-term effect of various doses of cyclosporin A on plasma lipoproteins and its distribution in blood: an experimental study. *Hum Exp Toxicol* 1993;12:141-6.
36. Luke DR. Immunosuppressive effect of cyclosporine in the hyperlipidemic rat model. *Biopharm Drug Dispos* 1992;13:635-45.
37. Mason J. The pathophysiology of Sandimmune (cyclosporine) in man and animals. *Pediatric Nephrology* 1990;4:554-74.
38. Lopez-Miranda J, Vilella E, Perez-Jimenez F, et al. Low-density lipoprotein metabolism in rats treated with cyclosporine. *Metabolism* 1993;42:678-83.
39. Espino A, Lopez-Miranda J, Blanco-Cerrada J, et al. The effect of cyclosporine and methylprednisolone on plasma lipoprotein levels in rats. *J Lab Clin Med* 1995;125:222-7.