

Nifedipina promove diminuição da qualidade óssea em ratas com osteopenia

Nifedipine decreases bone quality in female rats with osteopenia

Dernival Bertoncetto¹, Andrezza Ferreira da Silva², Juliana Almeida de Souza Borges²

Estudo desenvolvido no Curso de Fisioterapia da Uniube – Universidade de Uberaba, Uberaba, MG, Brasil

¹ Prof. Dr. adjunto do Curso de Fisioterapia da UFTM – Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG

² Fisioterapeutas; pós-graduandas em Fisioterapia Hospitalar Geral na UFTM

ENDEREÇO PARA
CORRESPONDÊNCIA

Prof. Dr. Dernival Bertoncetto
Curso de Fisioterapia /UFTM
Av. Frei Paulino 30 Abadia
38025-180 Uberaba MG
e-mail:
bertoncetto@fisioterapia.uftm.edu.br

APRESENTAÇÃO
jul. 2008

ACEITO PARA PUBLICAÇÃO
nov. 2008

RESUMO: O objetivo do trabalho foi avaliar, por parâmetros biomecânicos e físicos, a qualidade óssea dos fêmures de ratas ovariectomizadas tratadas com nifedipina. Foram utilizadas 28 ratas Wistar, de 4 meses de idade, divididas nos grupos: intactas (Int); ovariectomizadas tratadas com salina (Ovx+Sal); ovariectomizadas tratadas com nifedipina (Ovx+Nfd), intactas tratadas com nifedipina (Int+Nfd). O tratamento durou oito semanas, seis dias por semana, com administração de nifedipina ou salina, por gavagem, na dose de 10 mg e 0,1g/100g PC respectivamente. Tendo-se retirado o fêmur direito de cada animal, verificou-se a carga máxima suportada, a densidade mineral e a qualidade óssea. Os resultados foram analisados estatisticamente, com nível de significância fixado em $p < 0,05$). Houve diminuição significativa da carga máxima dos fêmures dos animais tratados com nifedipina (grupos Oxv+Nfd e Int+Nfd). Nesse último grupo, houve aumento significativo da densidade mineral. Os resultados mostram que o tratamento com nifedipina promove pior qualidade óssea dos fêmures de ratas.

DESCRITORES: Densidade óssea; Doenças ósseas metabólicas; Nifedipina; Ratos

ABSTRACT: The aim of this study was to assess, by biomechanical and physical parameters, the bone quality of femurs from ovariectomized female rats treated with nifedipine. Twenty eight Wistar female rats, 4 months old, were divided into four groups: intact (Int); intact treated with nifedipine (Int+Nfd); ovariectomized treated with saline (Ovx+Sal); ovariectomized treated with nifedipine (Ovx+Nfd). Treatment was carried out for eight weeks, six days per week, with administration of 10 mg of nifedipine or 0.1/100g BW of saline, by gavage. After removing the right femur of each animal, maximum load support, mineral density, and bone quality were assessed. Results were statistically analysed and significance level set at $p < 0.05$. A significant reduction of maximal load support was found in femur of rats treated with nifedipine (Ovx+Nfd and Int+Nfd groups). In the latter group, a significant increase in mineral density was noticed. Results show that treatment with nifedipine resulted in lower bone quality.

KEY WORDS: Bone density; Bone diseases, metabolic; Nifedipine; Rats

INTRODUÇÃO

Sabe-se que o osso é uma forma rígida de tecido conjuntivo que está geralmente disposto em estruturas definidas, agrupadas em células (principalmente osteoblastos e osteoclastos) e uma matriz extracelular formando o esqueleto. A matriz intercelular é formada por uma fração orgânica e outra inorgânica. A fração orgânica do tecido ósseo consiste em 90% a 95% de fibras colágenas e o restante é constituído por meio gelatinoso homogêneo denominado substância amorfa. Os componentes inorgânicos proporcionam rigidez ao osso e são constituídos principalmente de fosfato e de carbono de cálcio, com baixa quantidade de hidróxido, fluoreto e sulfato de magnésio, variando segundo a idade e uma série de fatores de dieta^{1,2}.

Segundo Bedani e Rossi³, o cálcio tem grande importância para a prevenção de algumas doenças, inclusive a osteoporose, e estudos demonstram relação positiva com a sua suplementação na dieta. Essa doença é considerada importante problema de saúde pública e está presente, em média, em 15% da população mundial de 50-59 anos de idade⁴, provavelmente afetando 15 milhões de brasileiros. Manifesta-se no decorrer da idade e principalmente em mulheres pós-menopausa, pois não há tratamento eficaz e sim preventivo. Sabe-se que está relacionada à remodelação óssea e, conseqüentemente, ligada ao cálcio⁵.

Alguns estudos demonstram o papel da nifedipina como bloqueador de canais de cálcio em tecido muscular liso e esquelético, porém há certa escassez de estudos quanto à sua interferência no tecido ósseo^{6,7}. Duarte *et al.*⁷ realizaram um experimento de curta duração, em que avaliaram a influência da administração de ciclosporina ou nifedipina e sua interrupção sobre a densidade óssea em uma região lateral à superfície de implantes de titânio inseridos em coelho, concluindo que a nifedipina não apresentou influência negativa na densidade do osso.

A nifedipina, indicada em casos de hipertensão arterial e doença arterial coronariana^{8,9}, é uma droga administrada por via oral, caracterizada pelo acentuado efeito de primeira passagem,

pela elevada ligação às proteínas plasmáticas e metabolismo extenso. Ela bloqueia a entrada do íon cálcio ao longo das zonas selecionadas sensíveis à voltagem, chamadas canais lentos, através das membranas celulares do músculo liso e cardíaco. Ao diminuir a concentração de cálcio intracelular, dilata as artérias coronárias, artérias e arteríolas periféricas, e pode diminuir a frequência cardíaca, reduzir a contratilidade miocárdica e retardar a condução nodal átrio-ventricular.

Souza *et al.*¹⁰ avaliaram a influência da nifedipina no bloqueio neuromuscular produzido pelo atracúrio e cistracúrio (anestésicos) em um estudo em preparações do nervo frênico-diafragma de ratos e concluíram que a nifedipina potencializou o bloqueio neuromuscular produzido pelo atracúrio e cistracúrio, onde estudos eletrofisiológicos demonstraram ação pré-sináptica e ausência de ação despolarizante sobre a fibra muscular. Embora a nifedipina administrada isoladamente não altere a amplitude das respostas musculares, ela aumenta significativamente a atividade bloqueadora neuromuscular produzida pelos anestésicos.

Petermann *et al.*⁶ avaliaram o efeito da nifedipina nas reservas musculares de glicogênio em ratos imobilizados e constataram aumento nessas reservas energéticas, sugerindo que a nifedipina interfere no processo da atrofia desencadeada pelo período inicial de desuso da musculatura. Verificaram que a nifedipina impediu a proteólise em decorrência da imobilização, constatando que ela reduz a atividade das proteases cálcio-dependentes.

A administração da nifedipina, um bloqueador de canais de cálcio, é sugestiva para realização de uma análise óssea pelo fato de a literatura relatar que ela não tem efeito sobre a densidade óssea. Apesar de os estudos abordarem sua atuação sobre o tecido muscular, não são bem conhecidos os efeitos no osso de indivíduos osteopênicos. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da nifedipina sobre o tecido ósseo de ratos osteopênicos, por parâmetros biomecânicos e físicos. A rata ovariectomizada constitui modelo experimental de osteopenia e seu estudo permite

inferências para intervenções terapêuticas sobre o tecido ósseo, na prevenção de alterações estruturais ou da perda de massa óssea.

METODOLOGIA

Este foi um ensaio controlado randomizado. Foram utilizadas 28 ratas Wistar, com 4 meses de idade, provenientes do biotério da Universidade de Uberaba. Elas ficaram mantidas em um regime de claro/escuro de 12 horas e temperatura controlada, com água e ração comercial à vontade, durante todo o período de experimento.

Para realização do trabalho, conforme as normas do comitê de ética em pesquisa institucional, foram seguidos todos os princípios propostos por alguns autores¹¹ e ratificados pela Unesco, em 1978, que elaborou a Declaração dos Direitos dos Animais. O experimento cercou-se de todos os cuidados necessários para evitar o sofrimento de cada animal¹².

Os animais foram divididos nos seguintes grupos: ovariectomizadas tratadas com salina (Ovx+Sal, n=7); ovariectomizadas tratadas com nifedipina (Ovx+Nfd, n=7); intactas (Int, n=7): intactas tratadas com nifedipina (Int+Nfd, n= 7). A ovariectomia foi realizada conforme técnica descrita por Zarrow *et al.*¹³.

O tratamento dos animais ocorreu durante oito semanas, seis dias por semana. A dose de nifedipina foi de 0,1 ml, por gavagem, diariamente, entre 10-12 h. A dose de salina utilizada foi de 0,1 ml/100g peso corporal (PC), por gavagem, também diariamente, entre 10 e 12 h.

No decorrer das seis semanas de tratamento, semanalmente, foram verificados os valores de peso corporal dos animais, a fim de preparar a solução a ser injetada, de acordo com o peso de cada uma, bem como para avaliar o ganho de peso corporal.

Análise óssea

Para obtenção dos valores da carga máxima, volume ósseo, densidade mineral, densidade óssea e qualidade do

osso, a análise óssea foi realizada pelas propriedades físicas do fêmur direito e o ensaio mecânico de flexão a três pontos.

No final do experimento os animais foram sacrificados utilizando tiopental. Foram retirados os fêmures, dissecados e mantidos em salina a 0,9% a -20 °C. Doze horas antes dos ensaios, os ossos foram descongelados à temperatura ambiente e mantidos em solução salina até o momento imediatamente anterior ao teste. Foram medidos os comprimentos dos fêmures direitos com um paquímetro. Os ensaios mecânicos foram realizados numa máquina de ensaio universal Emic DL3000, em temperatura ambiente, do Laboratório de Pesquisa em Odontologia da Universidade de Uberaba. As extremidades do fêmur ficaram apoiadas em dois roletes com diâmetro de 3 mm, suportados por apoios distanciados de 20 mm.

A força foi aplicada perpendicularmente ao eixo longitudinal do osso, no sentido pósterio-anterior, no meio da distância entre os dois apoios, por uma haste cilíndrica com um rolete de 3 mm fixada em sua extremidade, numa velocidade constante de 0,5 cm/min até a fratura do osso. Os gráficos de força por deslocamento permitiram obter valores de carga máxima suportada pelas amostras até a fratura, e do deslocamento do travessão na carga máxima (em mm).

Após o teste biomecânico, os ossos foram mantidos em água destilada e colocados no dessecador durante 24 horas a fim de ser retirado o ar dos poros ósseos. Foram verificadas as seguintes medidas de peso do osso: peso imerso (Pi) e peso úmido (P). A seguir, os ossos foram colocados em estufa a 100 °C durante 24 horas para serem desidratados. Obteve-se em seguida o peso seco (Ps). No passo seguinte, os ossos foram colocados numa mufla a 800 °C durante 24 horas a fim de se obter somente o material mineral, do qual também se verificou o peso (Pm)^{14,15}.

Para obtenção de todas as medidas citadas, foi utilizada balança eletrônica (Chyo). Seguindo o princípio de Arquimedes, foram calculadas a densidade óssea e mineral dos fêmures direitos, bem como os respectivos percentuais ósseos.

Após a obtenção dos resultados referentes à densidade mineral e ao teste de flexão do fêmur direito, esses dados foram relacionados entre si a fim de se verificar a qualidade óssea, identificada pela força máxima normalizada¹⁶.

ração entre os grupos foi utilizado o teste de Tukey-Kramer, sendo adotado para ambos um nível de significância de 5%.

RESULTADOS

Em relação ao ganho de massa corporal dos animais, observou-se diferença significativa comparando o grupo Ovx+Sal com o de ratas intactas e intactas tratadas com nifedipina (Gráfico 1).

Análise dos resultados

Para a análise simultânea dos grupos foi utilizado o teste Anova e para compa-

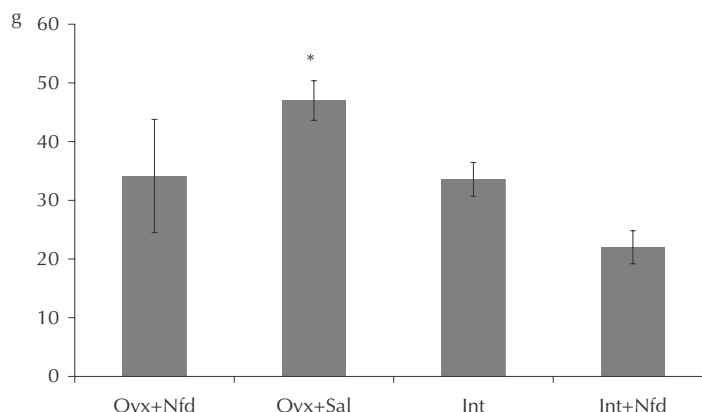


Gráfico 1 Valores médios do ganho de peso corporal dos animais por grupo (* $p < 0,05$ vs Int e Int+Nfd)

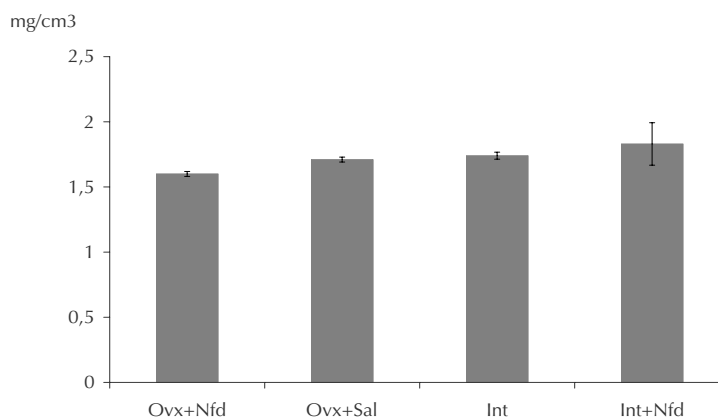


Gráfico 2 Valores médios de densidade óssea dos fêmures por grupo

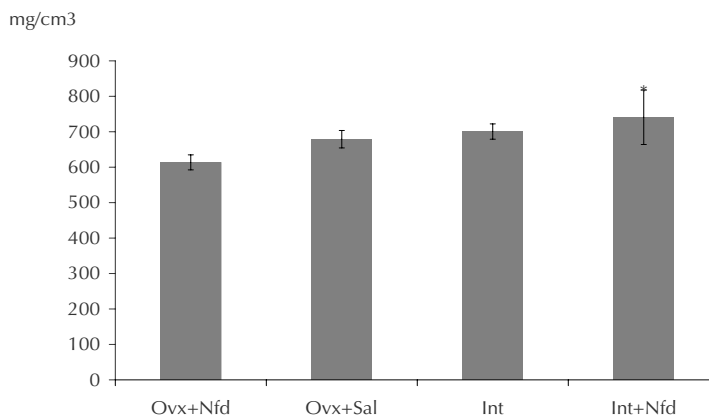


Gráfico 3 Valores médios de densidade mineral dos fêmures por grupo (* $p < 0,01$ vs Ovx+Nfd)

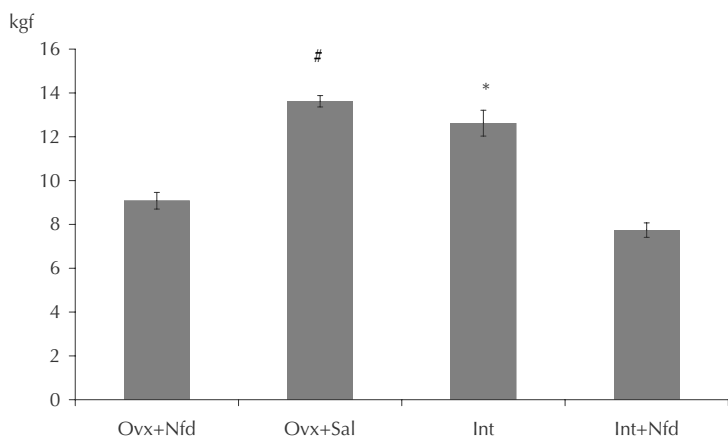


Gráfico 4 Valores médios de carga máxima suportada pelos fêmures por grupo (* $p < 0,05$ vs Int+Nfd; # $p < 0,05$ vs Ovx+Nfd)

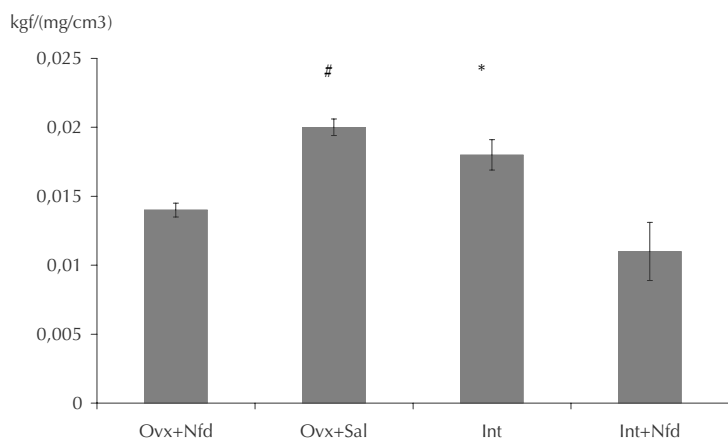


Gráfico 5 Valores médios da qualidade óssea dos fêmures (* $p < 0,05$ vs Int+Nfd; # $p < 0,05$ vs Ovx+Nfd)

Não houve diferença significativa entre os valores de densidade óssea comparando os quatro grupos, conforme o Gráfico 2.

O Gráfico 3 indica os valores de densidade mineral dos fêmures dos animais. Houve diferença significativa entre os grupos Ovx+Nfd ($613,64 \pm 21,3$) e Int+Nfd ($785,211 \pm 52,33$).

Houve diferença significativa entre os valores da carga máxima suportada, comparando os grupos Ovx+Sal ($13,6 \pm 0,2$) e Int ($12,6 \pm 0,6$) em relação aos demais grupos, como mostra o Gráfico 4.

O Gráfico 5 apresenta a qualidade óssea dos fêmures. Houve maiores valores para os grupos Ovx+Sal ($0,0201 \pm 0,0006$) e Int ($0,0181 \pm 0,0011$), comparados cada qual com seu controle que recebeu nifedipina.

O músculo esquelético contém canais de cálcio tipo lento, semelhante ao observado nos músculos cardíaco e liso vascular, com locais especiais de ligação para os bloqueadores de canais de cálcio. Esses canais, nos músculos liso vascular e cardíaco, encontram-se situados sobre toda a membrana muscular e são muito sensíveis aos bloqueadores de canais de cálcio, enquanto que no músculo esquelético são menos sensíveis e localizam-se no sistema tubular transverso. Devido a essas particularidades, alguns processos fisiológicos na junção neuromuscular ou no músculo podem ser alterados por drogas bloqueadoras de canais de cálcio⁹.

Sugere-se que a situação de relaxamento muscular prolongado devido ao tratamento com nifedipina possa interferir na mineralização óssea de forma indireta, uma vez que deixa de haver estímulo mecânico, essencial para as células responsáveis pela deposição de cálcio sobre a matriz.

No corpo humano adulto há cerca de 1.200g de cálcio, dos quais no mínimo 99% estão depositados no osso e o restante disposto nas células e no líquido extracelular, mantendo a homeostasia. A concentração de cálcio é regulada com extrema precisão, sendo essencial para que haja desempenho adequado em muitos processos fisiológicos, como a contração do músculo esquelético, cardíaco e liso, coagulação sanguínea, transmissão de impulsos nervosos e formação do tecido ósseo. Os íons magnésio, sódio, potássio e carbonato também estão presentes entre os sais ósseos. Esses íons e o cálcio são absorvidos pelo intestino no tubo digestivo e pelas células de absorção óssea, principalmente na presença de vitamina D^{1,2}.

Propõe-se, então, que o tratamento com nifedipina possa interferir nos níveis séricos de cálcio, alterando o processo de absorção de cálcio por meio da vitamina D, reduzindo assim a absorção do íon pelo trato gastrointestinal.

As células osteogênicas são constituídas por três tipos: os osteoblastos, os osteócitos e os osteoclastos, que são células relacionadas à formação de matéria óssea do osso em crescimento. Os osteoblastos secretam os componen-

DISCUSSÃO

A nifedipina é um antagonista bloqueador de canal de cálcio tipo II do grupo de dihidropiridina. É utilizada em várias situações clínicas em que se deseja relaxamento de musculatura, principalmente a lisa. Ela reduz a amplitude e frequência de contrações musculares e, portanto, atua como importante fármaco para controle da hipertensão^{17,18}.

Sabe-se que os bloqueadores de canais de cálcio atuam impedindo o influxo do mineral através da membrana dos canais lentos de cálcio. Alteram, assim, a concentração de cálcio e de adenosina monofosfato cíclico pré-sináptica. Com isso, inibem a transmissão neuromuscular e a contração muscular propriamente dita¹⁹.

tes orgânicos da matriz, tendo certa influência sobre a incorporação de minerais. Os osteócitos aparecem a partir de osteoblastos, por modulação, e atuam na manutenção dos constituintes da matriz intercelular em níveis normais. Os osteoclastos estão normalmente situados em depressões onde esta ocorrendo reabsorção óssea. Os íons cálcio e fosfato, principais compostos orgânicos do tecido ósseo, reagem entre si para formar um composto relativamente insolúvel, o fosfato de cálcio, que forma a hidroxiapatita, o principal sal do osso, oferecendo resistência do osso à compressão^{1,2}.

À medida que a matriz óssea é formada, os osteoblastos ficam envolvidos por ela e passam a ser denominados osteócitos. Essas células têm como função manter a viabilidade do tecido ósseo e reabsorver a matriz e os minerais do osso pela osteólise osteocítica, mecanismo de reabsorção profunda, essencial para manter constantes os níveis de cálcio extracelulares¹⁸.

A nifedipina, ao atuar nos níveis séricos de cálcio, pode interferir na sobre-

posição desse mineral na estrutura óssea. Apesar de interferir na absorção de cálcio pelo epitélio intestinal, supõe-se que, direta ou indiretamente, atue promovendo a retirada de cálcio da matriz orgânica rígida, a fim de manter o nível sanguíneo normal quando a absorção não é suficiente, causando um desequilíbrio entre as células osteogênicas¹⁹.

A reabsorção óssea tem a função vital de manter constantes os níveis de cálcio extracelulares. A síntese e mineralização da matriz óssea têm como principais objetivos repor o tecido ósseo perdido pelo processo catabólico e suprir as necessidades do órgão de se adaptar às condições funcionais. Ao longo da vida do indivíduo, vão sendo acumulados desequilíbrios entre esses dois processos, principalmente em função da isocalcemia. Com a supremacia do processo catabólico, a perda óssea se instala, principalmente se fatores inibidores da neoformação óssea, como os inerentes à senescência, estiverem associados. Assim, alterações no metabolismo, na absorção de cálcio e no perfil hormonal, principalmente em mulheres após a menopausa, associadas à inatividade

física, contribuem para um balanço negativo no equilíbrio da remodelação óssea, tendo a osteoporose como principal consequência²⁰.

Com base nos resultados aqui encontrados, sugere-se que o tratamento com nifedipina possa não prevenir o indivíduo quanto ao desenvolvimento da osteoporose, aumentando assim o risco de fraturas, por interferir de forma negativa na qualidade do tecido ósseo.

Devido ao fato de que muitos indivíduos têm indicação para uso da nifedipina, estudos mais específicos devem ser realizados para corroborar estes resultados. O uso da nifedipina de forma isolada ou combinada a outra terapêutica poderia auxiliar no controle da hipertensão mas predispor a pessoa a alguma disfunção no metabolismo do cálcio ósseo.

CONCLUSÃO

O tratamento com nifedipina promove menor tolerância à carga máxima, o que se reflete em menor qualidade óssea dos fêmures de ratas.

REFERÊNCIAS

- 1 Bailey FR, Copenhaver WM, Bunge PP, Bunge MB. *Histologia*. São Paulo: Edgard Blucher; 1973.
- 2 Guyton AC, Hall JE. *Tratado de fisiologia médica*. 10a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000.
- 3 Bedani R, Rossi EA. O consumo de cálcio e a osteoporose. *Semin Cienc Biol Saude*. 2006;26(1):3-14.
- 4 Brasil. Ministério da Saúde. Datasus: banco de dados online. Brasília; 2007. Disponível em: <http://www.datasus.gov.br>.
- 5 Costa-Paiva L, Horovitz AP, Santos AO, Fonsechi-Carvasan GA, Pinto-Neto AMP. Prevalência de osteoporose em mulheres na pós-menopausa e associação com fatores clínicos e reprodutivos. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2003;25(7):507-12.
- 6 Ptermann CED, Cancelliero KM, Silva CA. Tratamento com nifedipina, um bloqueador de canais de cálcio, melhora o conteúdo muscular de glicogênio de membro imobilizado de ratos. *Rev Bras Fisioter*. 2005;9(2):181-6.
- 7 Duarte PM, Nogueira Filho GR, Sallum EA, Sallum AW, Nociti Jr FH. Terapia imunossupressora não afeta a densidade do osso preexistente ao redor de implantes de titânio inseridos em coelhos. *Pesq Odontol Bras*. 2003;17(4):362-6.
- 8 Harvey RA, Champe PC. *Farmacologia Ilustrada*. 2a ed. São Paulo: Artmed; 1997.
- 9 Goodman LS, Gilman A. *As bases farmacológicas da terapêutica*. 11a ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill; 2006.
- 10 Souza SR, Braga AFA, Potério GMB, Braga FSS, Loyola YCS, Fernandes SCA. Influência da nifedipina no bloqueio neuromuscular produzido pelo atracúrio e pelo cisatracúrio: estudo em preparações do nervo frênico-diafragma de rato. *Rev Bras Anestesiol*. 2006;56(2):157-67.
- 11 Russell WMS, Burch RL. *The principles of humane experimental technique*. London: Methuen; 1959.
- 12 Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain*. 1983;16:109-10.

Referências (cont.)

- 13 Zarrow MX, Yochim JM, McCarthy JL. Experimental endocrinology: a sourcebook of basic techniques. New York: Academic Press; 1964.
- 14 Canotilho MM. Osteoporose experimental em ratas: efeitos da administração crônica de ácido acetilsalicílico [dissertação]. São Carlos: Universidade Federal de São Carlos; 1996.
- 15 Bertoncetto D, Nonaka KO. Efeitos do tratamento com melatonina sobre o tecido ósseo de ratos castrados [dissertação]. São Carlos: Universidade Federal de São Carlos; 2001.
- 16 SÆgaard CH, Danielsen CC, Thorling EB, Mosekilde L. Long-term exercise of young and adult female rats: effect on femoral neck biomechanical competence and bone structure. *J Bone Min Res.* 1994;9(3):409-16.
- 17 Stocche RM, Garcia LV, Klamt JG, Pachione A, Yu HH, Oliveira WA. Comparação entre nifedipina por via sublingual e clonidina por via venosa no controle de hipertensão arterial peri-operatória em cirurgias de catarata. *Rev Bras Anesthesiol.* 2002;52(4):426-33.
- 18 Cifuentes R, Santacruz DA, Martinez DM. Uso de nifedipina en el manejo de la hiperestimulación uterina producida por misoprostol. *Colomb Med.* 2003;34(3):107-10.
- 19 Sekerci S, Tulunay M. Interactions of calcium channel blockers with non-depolarising muscle relaxants in vitro. *Anaesthesia.* 1996;51:140-4.
- 20 Ocarino NM, Serakides R. Efeito da atividade física no osso normal e na prevenção e tratamento da osteoporose. *Rev Bras Med Esporte.* 2006;12(3):164-8.