ROGÉRIO BONFANTE MORAES

**EFEITOS DO BLOQUEADOR DE CANAIS DE CÁLCIO AMLODIPINA
NA REPARAÇÃO ÓSSEA EM DEFEITO CIRÚRGICO NO RAMO
MANDIBULAR DE RATOS**

São Paulo

2009

Rogério Bonfante Moraes

**Efeitos do Bloqueador de Canais de Cálcio Amlodipina na
Reparação Óssea em Defeito Cirúrgico no Ramo Mandibular de
Ratos**

Dissertação apresentada a Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obter o título de mestre, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas.

Área de concentração: Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial

Orientador: Prof. Dr. João Gualberto de C. Luz

São Paulo

2009

Catálogo-na-Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Moraes, Rogério Bonfante

Efeitos do bloqueador de canais de cálcio amlodipina na reparação óssea em defeito cirúrgico no ramo mandibular de ratos / Rogério Bonfante Moraes; orientador João Gualberto de C.Luz. -- São Paulo, 2009.

104p. : tab., fig.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas. Área de Concentração: Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial) -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

1. Bloqueadores do canal de cálcio – efeitos adversos 2. Fraturas mandibulares 3. Fraturas ósseas

CDD 615
BLACK D722

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTES TRABALHOS, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE E COMUNICADA AO AUTOR A REFERÊNCIA DA CITAÇÃO.

São Paulo, ____/____/____

Assinatura:

E-mail:

FOLHA DE APROVAÇÃO

Moraes RB. Efeitos do bloqueador de canais de cálcio amlodipina na reparação óssea em defeito cirúrgico no ramo mandibular de ratos [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2009.

São Paulo, ____/____/____

Banca Examinadora

1) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

2) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

3) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais Gil e Eliza, pelo amor e carinho de sempre, e por todo apoio incondicional à minha busca pela carreira nesta especialidade de
Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial

À Simone Pascotto Moraes, minha esposa, com amor, admiração e gratidão por sua compreensão, carinho, presença e incansável apoio ao longo do período de elaboração deste trabalho.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao Prof. Dr. João Gualberto de C. Luz, meu orientador neste trabalho, e verdadeiro Mestre em minha vida, que me iniciou tanto na carreira clínica da Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial quanto na carreira científica e sempre me motivou a seguir em frente. Agradeço pela dedicação, disponibilidade, paciência e alegria que esteve presente em nossos encontros onde sempre acontecia um novo aprendizado. A você, um verdadeiro amigo, que tenho grande admiração, meus sinceros agradecimentos.

AGRADECIMENTOS

A todos os professores do Departamento de Cirurgia, Prótese e Traumatologia Maxilo Faciais, especialmente: Prof. Dr. Antônio Carlos de Campos, Profa. Dra. Maria Cristina Zindel Deboni, Profa. Dra. Maria da Graça Naclério Homem e Prof. Dr. Élio Hitoshi Shinohara.

Aos amigos do programa de pós-graduação em CTBMF, mestrado e doutorado, por compartilhar as dificuldades, alegrias, vitórias e momentos de descontrações encontradas durante todo o período do curso.

A Dra. Lucimar Rodrigues pela amizade, e por todo ensinamento e apoio doado no Laboratório de Cirurgia Experimental da FOUSP.

A Prof^a. Dra. Luciana Correia, grande colaboradora e amiga, que possibilitou a realização do estudo bioquímico deste trabalho.

Ao Secretário Édison Henrique Vicente, que sempre disponível, me ajudou em diversos a fazeres dentro do departamento.

As funcionárias do Departamento de Cirurgia Oral, Cida, Natália, Ângela e Roseli, pela amizade que se formou entre nós.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram na realização deste trabalho.

***“Só aqueles que têm paciência para realizar coisas simples com perfeição é
que irão adquirir habilidades para fazer coisas difíceis com facilidade”***

Autor desconhecido

Moraes RB. Efeitos do bloqueador de canais de cálcio amlodipina na reparação óssea em defeito cirúrgico no ramo mandibular de ratos [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2009.

RESUMO

Os anti-hipertensivos bloqueadores de canais de cálcio, por interferirem no transporte de cálcio através das membranas celulares, podem afetar muitos processos metabólicos, incluindo o metabolismo ósseo. O objetivo deste estudo foi avaliar, de forma radiográfica, histológica e bioquímica, os efeitos do bloqueador de canais de cálcio amlodipina no processo de reparo de um defeito ósseo, simulando fratura, no ramo mandibular de ratos. Foram utilizados 50 ratos machos Wistar, que foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico unilateral simulando fratura mandibular, e distribuídos em dois grupos de 25 animais: grupo experimental, que receberam amlodipina, via oral, na dosagem de 0,04 mg / rato / dia, iniciando 12 dias antes do procedimento e continuando até o sacrifício; grupo controle, que permaneceu não tratado. Os animais foram sacrificados nos períodos de 1, 7, 14, 30 e 90 dias pós-operatórios. Foram realizados testes bioquímicos de fosfatase alcalina e cálcio séricos. Exame radiográfico foi obtido para mensuração da área radiolúcida do defeito ósseo. O estudo histológico compreendeu a análise descritiva do processo de reparo ósseo e a avaliação histomorfométrica da quantidade de osso neoformado. Os valores numéricos foram submetidos a análises estatísticas. A análise radiográfica demonstrou maior área radiolúcida no interior do defeito ósseo para o grupo experimental, nos períodos de 14 ($p=0,016$), 30 ($p=0,009$) e 90

($p=0,028$) dias. Na análise histológica não se observaram atrasos no processo de reparo ósseo para ambos os grupos. Porém, na análise histomorfométrica, o grupo da amlodipina apresentou redução significativa do volume de osso neoformado nos períodos de 7 e 14 dias ($p=0,049$), não havendo diferenças significativas no período de 30 dias. Houve redução significativa nos níveis de fosfatase alcalina para o grupo da amlodipina nos períodos iniciais ($p=0,049$). Não houve alterações para os níveis de cálcio sérico. Concluiu-se que o uso crônico da amlodipina prejudicou a neoformação óssea no processo de reparo do defeito cirúrgico no ramo mandibular de ratos, porém não impediu a consolidação da fratura.

Palavras-Chave: Bloqueadores dos Canais de Cálcio – Efeitos Adversos – Consolidação de Fraturas – Fraturas Mandibulares – Fraturas Ósseas

Moraes RB. Effects of the calcium channel blocker amlodipine on bone healing of a surgical defect in the mandibular ramus of rats [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2009.

ABSTRACT

Antihypertensive, calcium channel blockers, which interfere on calcium transport across the cell membrane, may affect many metabolic processes, including bone metabolism. The aim of this study was to evaluate by radiographic, histologic and biochemical analyses the effects of calcium channel blocker amlodipine on bone healing of a defect simulating a fracture in mandibular ramus of rats. Fifty male Wistar rats were used, and submitted to the same unilateral surgical procedure simulating a mandibular fracture, distributed into two groups of 25 animals: experimental group, which received oral doses of 0.04 mg / rat / day starting 12 days before of procedure and continuing until sacrifice; control group, which remained untreated. Animals were sacrificed at 1, 7, 14, 30 and 90 days postoperatively. Blood biochemical tests of alkaline phosphatase and serum calcium were made. Radiographic examination was obtained in order to mensurate the radiolucent area of bone defect. Histological study comprised descriptive analysis of bone healing and histomorphometric analysis of the amount of newly formed bone. Numerical values were submitted to statistical analyses. Radiographic analysis showed larger radiolucent area into bone defect to the experimental group at the periods of 14 ($p=0.016$), 30 ($p=0.009$) and 90 ($p=0.028$) days. In the histological analysis there was no delay in the bone repair stages in both groups. However, in the histomorphometric

analysis, the experimental group presented significative lowering of newly formed bone volume at 7 and 14 days periods ($p=0.049$), with no significant differences at 30 days period. There was significative decrease of alkaline phosphatase levels in experimental group in the initial periods ($p=0.049$). There was no change in the serum calcium levels. It was concluded that chronic use of amlodipine compromised bone neoformation in the repairing process of surgical defect in the mandibular ramus of rats, but no precluded occurrence of fracture consolidation.

Keywords: Calcium Channel Blockers – Adverse Effects – Fracture Healing – Mandibular Fractures – Fractures, Bone

LISTA DE FIGURAS

- Figura 4.1 – Desenho esquemático do modelo experimental. Defeito ósseo cirúrgico em ramo mandibular de rato.....55
- Figura 4.2 – Forma de apresentação do medicamento utilizado no estudo. Frascos de 100 ml.....56
- Figura 4.3 – Administração oral de amlodipina. A e B – Técnica para apreensão do rato; C – Intubação gástrica (gavagem) com uma cânula metálica de gavagem para ratos acoplada a uma seringa plástica de 5 ml utilizada na administração do medicamento.....57
- Figura 4.4 – Imagens transoperatórias da confecção do defeito ósseo vertical no ramo mandibular do rato. A – Tricotomia submandibular; B – Incisão submandibular; C – Acesso ao ramo mandibular; D – Defeito ósseo vertical; E – Sutura do plano muscular; F – Sutura da pele.....59
- Figura 4.5 – Imagem obtida do monitor do computador, demonstrando a medição da área radiolúcida do defeito ósseo no programa ImageLab 2000.....61
- Figura 4.6 – Desenho esquemático de mandíbula de rato demonstrando o defeito ósseo cirúrgico e o posicionamento do corte histológico.....63
- Figura 5.1 – Imagem radiográfica de uma hemimandíbula no período de 1 dia. Seta indicando imagem radiolúcida correspondente ao defeito ósseo mandibular.....65
- Figura 5.2 – Imagens radiográficas das hemimandíbulas no período de 7 dias.
A - Grupo controle; B – Grupo experimental.....66
- Figura 5.3 – Imagens radiográficas das hemimandíbulas no período de 14 dias.
A - Grupo controle; B – Grupo experimental.....67
- Figura 5.4 – Imagens radiográficas das hemimandíbulas no período de 30 dias.
A - Grupo controle; B – Grupo experimental.....68

Figura 5.5 – Imagens radiográficas das hemimandíbulas no período de 90 dias.

A - Grupo controle; B – Grupo experimental.....69

Figura 5.6 – Cortes histológicos representativos do grupo experimental nos períodos de 1 e 7 dias, (HE). **A - 1 dia** - Intenso exsudato neutrofílico no interior e ao redor do defeito, dissociando fibras musculares (Φ) (40X); **B – 1 dia** – Exsudato neutrofílico e serofibrinoso no interior do defeito (Φ) (100X); **C - 7 dias** – Grande quantidade de tecido de granulação no interior do defeito (*) e infiltrado inflamatório mononuclear ao redor do defeito (40X); **D – 7 dias** - Osso neoformado a partir das corticais externas ($\uparrow$) (100X).....72

Figura 5.7 - Cortes histológicos representativos do grupo experimental nos períodos de 14, 30 e 90 dias, (HE). **A – 14 dias** – Grande quantidade de osso neoformado (Φ) (40X); **B – 14 dias** – Intensa atividade osteoblástica em meio ao osso neoformado (#) (100X); **C – 30 dias** – Osso neoformado em processo de maturação preenchendo o defeito ósseo (*) (40X); **D – 90 dias** – Osso maduro preenchendo o defeito ósseo ($\uparrow$) (40X).....74

Figura 5.8 - Cortes histológicos representativos do grupo experimental nos períodos de 1 e 7 dias, (HE). **A - 1 dia** – Processo inflamatório agudo entre as fibras musculares promovendo dissociação das mesmas (Φ) (40X); **B - 1 dia** - Intenso exsudato neutrofílico e serofibrinoso no interior do defeito ($\uparrow$) (100X); **C – 7 dias** - Tecido de granulação no interior do defeito ósseo ($\rightarrow$) (40X); **D – 7 dias** - Osso neoformado a partir das corticais externas (#) (100X).....75

Figura 5.9 - Cortes histológicos representativos do grupo controle nos períodos de 14, 30 e 90 dias, (HE). **A – 14 dias** – Grande quantidade de osso neoformado a partir das corticais externas das margens do defeito (*) (40X); **B – 14 dias** – Margem do defeito desvitalizada (#) e em processo de reabsorção (100X); **C – 30 dias** – Osso neoformado em processo de maturação preenchendo o defeito ósseo ($\uparrow$) (40X); **D – 90 dias** – Osso maduro com poucos espaços medulares preenchendo o defeito ósseo (#) - Remanescente do coto ósseo (*) (100X).....77

Figura 5.10 – Cortes histológicos de um espécime do grupo controle no período de 14 dias - **A** – coloração HE; **B** – coloração azul de toluidina. Intensa formação de cartilagem no interior e ao redor do defeito ósseo ($\uparrow$); osso neoformado a partir das corticais externas (*); margem do defeito ósseo desvitalizada ($\rightarrow$); seqüestro ósseo no interior do defeito (#). (40X).....77

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 5.1 – Gráfico demonstrativo dos valores médios, em milímetros², das áreas do defeito ósseo para os grupos controle e experimental de acordo com os períodos de sacrifício.....71
- Gráfico 5.2 – Gráfico demonstrativo dos valores médios, em milímetros², das áreas de osso neoformado observadas por todo o corte histológico de acordo com os períodos de observação.....79
- Gráfico 5.3 – Gráfico demonstrativo dos valores médios de fosfatase alcalina (medidos em U/L) segundo os grupos e períodos de observação....81
- Gráfico 5.4 – Gráfico demonstrativo dos valores médios de cálcio sérico (medidos em mg/dl) segundo os grupos e períodos de observação.....82

LISTA DE TABELAS

- Tabela 5.1 – Valores médios das áreas radiolúcidas observadas no interior dos defeitos ósseos e a significância entre os grupos experimental e controle de acordo com o período de observação. Valores em mm²...70
- Tabela 5.2 – Valores médios das áreas de osso neoformado observadas no interior e ao redor do defeito ósseo, e a significância entre os grupos experimental e controle de acordo com os períodos de observação de 7, 14 e 30 dias. Valores em mm².....78
- Tabela 5.3 – Valores médios dos níveis séricos de fosfatase alcalina e a significância entre os grupos experimental e controle de acordo com os períodos de observação. Valores em U/L.....80
- Tabela 5.4 – Valores médios dos níveis de cálcio sérico e a significância entre os grupos experimental e controle, de acordo com os períodos de observação. Valores em mg/dl.....82

SUMÁRIO

	p.
1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1 Efeitos terapêuticos e reações adversas	18
2.2 Efeitos sobre o metabolismo ósseo	25
2.3 Efeitos sobre os Osteoblastos	32
2.4 Efeitos Hormonais e reabsorção óssea	36
2.5 Reparação Óssea Controle	41
2.6 Dosagens	48
2.7 Hipertensão arterial sistêmica e metabolismo ósseo	49
2.8 Análises bioquímicas da atividade óssea	52
3 PROPOSIÇÃO	54
4 MATERIAL E MÉTODOS	55
4.1 Análise Estatística	63
4.2 Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa	64
5 RESULTADOS	65
5.1 Avaliação Radiográfica descritiva	65
5.2 Avaliação radiográfica objetiva	69
5.3 Avaliação histológica descritiva	71
5.4 Avaliação histomorfométrica	78
5.5 Análises bioquímicas	79
5.5.1 Fosfatase alcalina sérica	79
5.5.2 Cálcio sérico	81
6 DISCUSSÃO	83
7 CONCLUSÕES	96
REFERÊNCIAS	97
ANEXOS	103

1 INTRODUÇÃO

Doenças cardiovasculares tais como hipertensão arterial, angina ou arritmia cardíaca, têm sido tratadas com bastante sucesso, há mais de duas décadas, com os bloqueadores de canais de cálcio (YAMAZAKI et al., 1998). Estes medicamentos atuam de forma a bloquear o fluxo transmembrânico do cálcio nas células musculares lisas das arteríolas, diminuindo assim a pressão sanguínea por redução da resistência vascular periférica (CLEMENT; DE BUYZERE; DUPREZ, 1994). No entanto, além de ser o principal componente dos ossos, o cálcio tem função importante no controle de numerosas atividades celulares. Assim, estes antagonistas do cálcio, por interferir neste transporte através das membranas celulares, podem afetar muitos processos metabólicos, incluindo o metabolismo ósseo (DURIEZ et al., 1990; TEÓFILO; BRENTGANI; LAMANO CARVALHO, 2001).

A amlodipina, um anti-hipertensivo antagonista de cálcio de segunda geração, foi desenvolvida com o objetivo tanto de melhorar a eficácia terapêutica desta classe de medicamento quanto diminuir a frequência dos efeitos adversos (CLEMENT; DE BUYZERE; DUPREZ, 1994; VALCÁRCEL et al., 2006; VAN ZWIETAN, 1994). Porém, algum efeito adverso tem sido encontrado em estudos experimentais relacionado ao componente ósseo, com reduções significantes na massa trabecular e densidade óssea dos animais experimentados (DURIEZ et al., 1993). O metabolismo ósseo poderia ser alterado devido à presença de canais de cálcio em células osteoblásticas (GUGGINO et al., 1989; REDILICH et al., 1997) ou mesmo

por afetar a liberação de hormônios sexuais andrógenos, como a testosterona (ALMEIDA et al., 2000).

Um estudo que avaliou a reparação alveolar com o uso crônico da amlodipina observou retardo significativo na neoformação óssea reparacional associado a atraso na remissão / organização do coágulo sanguíneo (TEÓFILO; BRENTAGANI; LAMANO CARVALHO, 2001). Por outro lado o modelo de defeito ósseo mandibular simulando fratura permite a avaliação do processo de reparo por meio da formação de calo ósseo, sem comprometer significativamente a mastigação do animal (AGUIAR, 2008; RABEQUE et al., 2002; RODRIGUES; MIYAZAKI; LUZ, 2004). Até o presente momento nenhum estudo prévio foi feito para avaliar os efeitos da amlodipina no processo de reparo de fratura mandibular ou de qualquer outra fratura óssea.

Considerando o extenso uso dos bloqueadores dos canais de cálcio pela população e seus possíveis efeitos adversos sobre o metabolismo ósseo é pretensão estudar se o uso crônico do bloqueador de canais de cálcio Amlodipina interfere na reparação óssea de um defeito cirúrgico criado em ramo mandibular de ratos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Efeitos terapêuticos e reações adversas da amlodipina

A amlodipina, um bloqueador dos canais de cálcio do tipo dihidropiridina, tem um modo de ação e um perfil farmacodinâmico que são comparáveis aos dos compostos convencionais desta classe de medicamentos, como a nifedipina. O seu comportamento físico, no entanto, parece ser um pouco diferente. Um valor de pK_a 8,7 significa que a amlodipina está presente predominantemente na forma ionizada em um pH fisiológico. Possui, portanto, uma forte afinidade com a membrana celular. Esses fenômenos aparentemente contribuem para um perfil farmacocinético exclusivo da amlodipina, que é caracterizada pela absorção quase completa, concentrações plasmáticas com pico tardio, alta biodisponibilidade, e lenta biodegradação hepática. Esse perfil se traduz em potenciais benefícios clínicos, por força de um início de ação lento e efeito de longa duração. O lento início de ação pode explicar porque parece haver pouca taquicardia reflexa e uma menor incidência de efeitos colaterais vasodilatadores quando se compara a amlodipina com as dihidropiridinas convencionais. A lenta eliminação da amlodipina explica a duração da ação, o que permite uma conveniente dosagem de uma vez ao dia (VAN ZWIETEN, 1994).

Clement, De Buyzere e Duprez (1994) fizeram algumas considerações sobre os efeitos positivos observados com os antagonistas de cálcio. Segundo os

autores não existe dúvida que estes medicamentos são efetivos agentes antihipertensivos, pois reduzem a resistência vascular periférica. Sua potência é comparada aos beta-bloqueadores e aos inibidores da enzima conversora de angiotensina. Os novos membros desta classe de drogas, derivados diidropiridines, foram desenvolvidos para obter maior especificidade vascular e duração de ação mais longa. Além da redução da pressão sanguínea, observa-se regressão da hipertrofia ventricular esquerda, aumento do fluxo sanguíneo muscular, colabora no controle da angina do peito e possui pouco ou nenhum efeito adverso que ameace a vida.

Ghorayeb et al. (1994) avaliaram a eficácia e a tolerabilidade da amlodipina no tratamento prolongado da hipertensão arterial sistólica e diastólica leve e moderada no idoso. Foram estudados 30 pacientes, 18 do sexo feminino, com idades entre 64 a 84 anos, que após duas semanas sem medicação antihipertensiva apresentavam pressão arterial sistólica (PAS), em posição sentada, igual ou maior que 160 mmHg e menor que 200 mmHg, e pressão arterial diastólica (PAD), igual ou maior que 95 mmHg e menor que 114 mmHg. Nas primeiras duas semanas, os pacientes receberam comprimido de placebo com aspecto idêntico ao da droga ativa. Na terceira semana iniciou-se o tratamento com comprimidos de amlodipina (5mg) diariamente pela manhã. Nos pacientes em que a PAD era menor ou igual a 95 mmHg e PAS menor que 160mmHg foi mantida a posologia inicial. Nos demais acrescentou-se 1 comprimido de amlodipina, também pela manhã, perfazendo 10mg/dia em tomada única. O tratamento teve duração de 52 semanas. Em 23 casos, a dose diária foi de 5mg. Nos demais, 10mg. Não houve diferenças significativas entre frequência cardíaca média no final da fase placebo e ao termino

do tratamento. A pressão sistólica média ao final da fase placebo foi de 178,5+10,2 mmHg e ao termino do estudo 134,4 +10,8 mmHg ($p < 0,001$). A pressão arterial diastólica média ao final da fase placebo foi de 102,9+3,7mmHg e ao termino do estudo 80,3 +2,1 ($p < 0,001$). A incidência de efeitos colaterais foi baixa e de leve intensidade, não havendo interrupção do tratamento em consequência dos mesmos. Foi concluído que a amlodipina em dose única diária de 5 a 10 mg é eficaz e bem tolerada no tratamento da hipertensão arterial leve e moderada em idosos.

Segundo Zanetti-Elshater et al. (1994), a amlodipina, um antagonista dos canais de cálcio, um derivado diidropiridínico, é um importante hipotensor graças à sua potente ação vasodilatadora arterial; tem efeitos natriurético, antiproliferativos e antiateroscleróticos. A amlodipina exerce um efeito antihipertensivo e duradouro tanto em pacientes com hipertensão primária quanto em pacientes com diabetes hipertensiva. Nestes casos, o medicamento também não interfere prejudicialmente no metabolismo lipídico, resposta insulínica a glicose e principalmente no controle da diabetes. Essa classe de anti-hipertensivos, entretanto, não promove vasodilatação venosa equiparável ao efeito arterial, o que gera um desequilíbrio de forças hidrostáticas no capilar periférico, facilitando o extravasamento de líquidos para o espaço intersticial, o que possibilita a formação de edema de membros inferiores. Edema de membros inferiores tem sido descrito como um efeito adverso freqüente dessa classe de anti-hipertensivos e que por muitas vezes é tido como causa de abandono de tratamento.

Yamazaki et al. (1998) examinaram os efeitos da amlodipina, um bloqueador dos canais de cálcio de longa duração utilizados no tratamento de

hipertensão e angina pectoris, comparado a nifedipina. Para tanto, utilizaram doses de amlodipina (8mg/kg/ 1 X ao dia) e doses de nifedipina (24mg/kg/ 3 X ao dia) em ratos adultos jovens hipertensos. A amlodipina e a nifedipina foram capazes de reduzir, de forma significativa, a pressão sanguínea sistólica, porém esta redução permaneceu por até 8 horas nos ratos tratados com nifedipina e por mais de 16 horas naqueles tratados com amlodipina. Diferente da nifedipina, a amlodipina preveniu de forma eficaz o aumento da espessura da parede ventricular, tanto nos níveis morfológicos quanto bioquímicos. Estes resultados sugerem que um antagonista dos canais de cálcio de longa duração, como a amlodipina, é mais eficaz que um antagonista de curta duração na prevenção de alterações importantes no coração de pacientes hipertensos.

Messerli, Weir e Neutel (2002) avaliaram o uso combinado da amlodipina e benazepril em pacientes com hipertensão leve a moderada que não apresentavam níveis aceitáveis de controle da doença com o uso apenas da amlodipina. Os pacientes foram selecionados baseados em um dos dois critérios a seguir: Grupo 1 - controle inadequado da pressão sanguínea pela amlodipina (diastólica ≥ 90 mmHg), ou Grupo 2 - intolerância a amlodipina (diastólica ≤ 90 mmHg porém com edema como efeito adverso). Os pacientes foram avaliados por 4 semanas. No grupo 1 (n = 6410), a média da pressão sanguínea diastólica reduziu de 96,5 mmHg para 84,9 mmHg, enquanto que a pressão sanguínea sistólica reduziu de 152,9 mmHg para 137,3 mmHg. No grupo 2, 85% dos pacientes tiveram alguma melhora no edema comparado aos níveis iniciais. Foi concluído que a combinação dos agentes antihipertensivos amlodipina / benazepril teve ação segura e efetiva no tratamento

de pacientes que apresentavam controle inadequado da pressão sanguínea ou do edema quando utilizavam monoterapia com amlodipina.

Nadar, Blann e Lip (2004), em um estudo para avaliar anormalidades nas plaquetas em pacientes hipertensos, encontraram que o tratamento com amlodipina por um período de 6 meses reduziu as alterações de massa, volume e fatores ativadores das plaquetas. Segundo os autores, estes achados podem contribuir na redução de complicações relacionadas a trombozes em pacientes que apresentarem uma redução na pressão sanguínea de forma efetiva.

Chrysant e Bakris (2004) realizaram um estudo comparando o uso combinado da amlodipina e benazepril com o uso apenas do benazepril no tratamento de pacientes hipertensos. Os autores encontraram que o uso combinado destes medicamentos foi significativo na redução da pressão sanguínea diastólica comparada ao uso isolado de benazepril. Os efeitos adversos foram raros e similares entre os grupos. Concluíram que a terapia combinada amlodipina / benazepril é uma opção tratamento bem tolerada, segura e eficaz para pacientes hipertensos que não respondem adequadamente ao tratamento com benazepril somente.

Kohlmann et al. (2006) realizaram um estudo com o objetivo de avaliar a eficácia, tolerabilidade e os efeitos metabólicos em médio e longo prazo (um ano) da combinação fixa de amlodipina e losartana versus amlodipina e losartana isoladamente. Foi um estudo multicêntrico brasileiro, randomizado, duplo-cego e comparativo realizado com 198 pacientes com hipertensão arterial primária em

estágios 1 e 2. Os resultados mostraram que a combinação fixa apresenta alta eficácia anti-hipertensiva que se mantém em longo prazo com percentual reduzido de escape do controle pressórico, inferior a dos dois regimes monoterápicos de comparação. Em longo prazo, mais de 60% dos pacientes tratados com a combinação fixa permaneceram com níveis da pressão arterial diastólica < 85 mmHg e o efeito anti-hipertensivo quando avaliado pela MAPA persistiu nas 24 horas com relação vale-pico de 76,7%. A frequência de eventos adversos foi bastante reduzida neste grupo sendo a incidência em longo prazo de edema de membros inferiores cerca de quatro vezes menor que a observada com a amlodipina isolada. A combinação fixa não alterou o metabolismo da glicose e dos lípides tanto em médio quanto em longo prazos. Os autores concluíram que estes resultados permitem afirmar que a combinação de amlodipina e losartana, a primeira combinação fixa de um antagonista dos canais de cálcio e um bloqueador do receptor da angiotensina II disponível no mercado farmacêutico constitui-se em excelente opção para o tratamento da hipertensão arterial em larga gama de pacientes hipertensos.

Valcárcel et al. (2006) neste estudo avaliaram a segurança e eficácia da amlodipina em dois grupos de pacientes (coortes) que foram atendidos em centros de tratamentos primários e especializados. Este estudo multicêntrico, prospectivo, observacional, incluiu pacientes com idade acima de 18 anos que apresentavam diagnóstico de hipertensão (sistólica ≥ 140 mmHg e diastólica ≥ 90 mmHg) havia pelo menos 6 meses, que estavam sem tratamento ou com a pressão arterial descontrolada. 4277 pacientes participaram do estudo. 2982 (69,7%) dos pacientes receberam monoterapia, enquanto o restante foi tratado com terapia combinada, principalmente os inibidores da enzima conversora de angiotensina (IECA) e os

diuréticos. Durante o estudo, 308 pacientes (7,2%) apresentaram reações adversas de intensidade leve ou moderada, na seguinte ordem decrescente: edema - 60%; cefaléia associada ou não a vertigem e/ou dificuldade respiratória; outras queixas diversas – 24%. Ocorreram apenas 20 casos de reações adversas graves como pneumonia, hiponatremia, dispnéia em repouso, insuficiência renal aguda, tuberculose, leucemia, linfoma, infarto, porém nenhum destes havia relação com a droga. No final do estudo, 1617 pacientes (37,8%), tinham alcançado o objetivo do tratamento (sistólica < 140 mmHg e diastólica < 90 mmHG), com maior grau de controle entre os pacientes que receberam terapia combinada comparado a monoterapia, e aqueles tratados em centros especializados comparado aos tratados em centros primários. Os autores concluíram que a amlodipina é uma droga bem tolerada e efetiva no tratamento da hipertensão arterial em um terço dos pacientes, tendo alcançado os objetivos terapêuticos principalmente em pacientes atendidos em centros especializados de atendimento e com terapia combinada a outros antihipertensivos.

Choi et al. (2009) avaliaram agentes antihipertensivos no controle da pressão sanguínea e severidade dos efeitos colaterais em ratos espontaneamente hipertensos. Foram utilizadas a amlodipina (0,3 mg / 100 mg) e losartana (3 mg / 100 mg), administradas por via oral. O efeito antihipertensivo de ambas as drogas foram obtidos após 4 semanas de uso crônico. O uso combinado das drogas reduziu para 3 semanas o período para se obter uma redução significativa da pressão sanguínea. Os autores concluíram que o uso combinado de amlodipina e losartana pode ser mais eficaz no tratamento da hipertensão do que a monoterapia.

2.2 Efeitos sobre o metabolismo ósseo

Duriez et al. (1990) avaliaram o efeito de um antagonista de cálcio, verapamil, na formação óssea em região heterotópica em ratos. A droga foi administrada na dose de 36 mg / dia, 6 dias por semana, por 5 meses. Após uma secção no tendão de Aquiles, a formação óssea foi avaliada através de exames radiográficos mensais por um período de 5 meses, e ao final por análise histológica. Os exames radiográficos mostraram menos ossificação em ratos tratados com verapamil quando comparado ao grupo controle que não fez uso da medicação. A avaliação histológica também confirmou estes dados. Por outro lado, apesar de um menor volume ósseo no grupo tratado com verapamil, não foi observada diferença significativa entre os grupos controle e experimental quanto a proporção de tecido osteóide e osso lamelar.

Boesgaard, Hyldstrup e Feldstedt (1991) investigaram os efeitos do Verapamil (antihipertensivo antagonista de cálcio) quanto ao metabolismo ósseo e homeostasia do cálcio, através de um estudo em pacientes randomizados, duplocego, controlado por placebo. Dez pacientes randomizados para o verapamil 120 mg e 9 pacientes randomizados ao placebo fizeram parte do estudo. A formação óssea estimada pela retenção de bisfosfonados, osteocalcina, fosfatase alcalina e índices metabólicos do cálcio foram registradas antes do início da medicação e após 1 e 6 meses do tratamento. Os índices metabólicos do cálcio não foram diferentes entre os dois grupos. Também não existiram diferenças significantes na retenção dos bisfosfonatos, nível de osteocalcina ou fosfatase alcalina após 6 meses de

tratamento com verapamil comparado ao placebo. Os níveis séricos do paratormônio, cálcio e fósforo também não foram afetados pelo verapamil. Os autores concluem que o tratamento prolongado com doses clínicas terapêuticas de verapamil não afeta os índices do cálcio nem o metabolismo ósseo em humanos.

Samnergard e Sjöden (1992) avaliaram os efeitos do verapamil sobre o tecido ósseo de ratos machos e fêmeas após longo período de uso da droga. Este antagonista dos canais de cálcio apresenta efeitos colaterais como inibição da absorção intestinal do cálcio e aumento do nível sérico do paratormônio em ratos. Os animais receberam verapamil na água a dose de 0.075 mg / ml (baixa dose) e 0.75 mg / ml (alta dose) por 12 semanas. Em ratas fêmeas, a quantidade de osso por volume reduziu significativamente de 0,742g / ml no grupo controle para 0,713g / ml no grupo baixa dose e para 0,667g / ml no grupo alta dose, interpretado como osteopenia. O comprimento da tíbia nas fêmeas aumentou de 39,7 mm no grupo controle para 40,3 mm no grupo baixa dose e para 40,7 mm no grupo alta dose. O volume da tíbia nas fêmeas também aumentou do grupo controle (0,385 ml) para o baixa dose (0,397 ml) e para o alta dose (0,429 ml). Diferentemente das fêmeas, os machos apresentaram um aumento significativo da quantidade de osso por volume, interpretado como maior mineralização e melhor qualidade óssea. O comprimento da tíbia não alterou entre os grupos nos machos, porém o volume ósseo tibial diminuiu de 0,633 ml grupo controle para 0,583 ml para o grupo alta dose. A absorção intestinal do cálcio diminuiu nos ratos machos comparando o grupo controle com os grupos baixa e alta dose de verapamil, enquanto que nas fêmeas a absorção intestinal do cálcio não foi alterada. Os autores concluíram que o tratamento crônico com verapamil, um antihipertensivo bloqueador dos canais de cálcio, induziu a

osteopenia em ratas fêmeas enquanto que em ratos machos o crescimento ósseo foi inibido.

Duriez et al. (1993) avaliaram os possíveis efeitos do bloqueador dos canais de cálcio, nifedipina, no crescimento e remodelação óssea em coelhos jovens. O grupo experimental recebeu por gavagem 6 mg / Kg / 2 X ao dia de nifedipina, durante 10 semanas. Com esta dose não ocorreu nenhum efeito tóxico ou redução no peso corporal dos ratos. Os resultados mostraram que no grupo experimental houve redução na osteogênese, volume ósseo esponjoso, aposição mineral e comprimento do úmero. Alterações morfológicas importantes foram encontradas nas zonas de crescimento epifisário dos animais experimentais. Os autores concluíram que a nifedipina afetou a fisiologia óssea, principalmente na quantidade de crescimento, podendo possivelmente também afetar os ossos em humanos, especialmente em pessoas jovens.

Amorin (1995) analisou os efeitos da isradipina, um antagonista dos canais de cálcio de 1ª geração, no processo de reparo em feridas de extração dental em ratos. Após administração de dose única (2,5 mg / Kg), os animais foram sacrificados após 3, 7, 14, 21 dias, e através de análise microscópica, observou que a isradipina não afetou a cronologia e a qualidade do processo de reparo alveolar em feridas de extração dental em ratos.

Redilich et al. (1997) realizaram um estudo comparativo dos efeitos dos bloqueadores dos canais de cálcio e do hormônio da paratireóide na indução de reabsorção óssea *in vitro*. Foram utilizados os bloqueadores dos canais de cálcio

tipo dihidropiridinas (amlodipina, nifedipina) assim como tipo fenilalquilaminas (verapamil, galopamil) e o hormônio da paratireóide em uma cultura orgânica com osso do crânio (parietal) de ratos recém nascidos. Quando foi testado o efeito dos bloqueadores dos canais de cálcio nas concentrações entre 10^{-6} e 10^{-4} M na reabsorção óssea basal, somente na última concentração foi observado algum efeito, em que todas as drogas inibiram por completo a liberação de cálcio do osso cultivado. Quando a reabsorção do osso cultivado foi induzida pelo paratohormônio (PTH), as composições com verapamil, galopamil e amlodipina foram ineficientes em parar a reabsorção óssea em concentrações de $\leq 10^{-5}$ M. Por outro lado estes mesmos compostos inibiram quase 100% a liberação do cálcio na concentração de 10^{-4} M. Diferentemente a nifedipina entre 10^{-6} e 10^{-4} M inibiu a reabsorção óssea induzida pelo PTH de uma maneira dose dependente até 58%. Em outro teste, quando o osso parietal do rato foi mantido em culturas com cada bloqueador dos canais de cálcio na concentração de 10^{-5} M por 48 horas e em seguida estimulado à reabsorção com o PTH, nenhum impediu a reabsorção óssea. Porém, na concentração de 10^{-4} M, somente a nifedipina apresentou reabsorção óssea com liberação de cálcio, enquanto que a amlodipina, verapamil ou galopamil impediram totalmente a ação de reabsorção do PTH. Com os resultados, os autores fizeram uma suposição de que apenas a nifedipina poderia interferir na reabsorção óssea através da ação específica nos canais de cálcio dos osteoblastos, porém as concentrações usadas foram no mínimo três vezes aquelas para bloquear os canais de cálcio em células endoteliais vasculares. Os autores concluíram que os bloqueadores dos canais de cálcio, em doses terapêuticas são improváveis de afetar o metabolismo ósseo em geral e mesmo que a nifedipina atuasse inibindo a

reabsorção óssea *in vivo*, isto não deveria ser visto como um efeito adverso e sim como um benefício à saúde óssea.

Teófilo, Brentegani e Lamano Carvalho (2001) investigaram se o tratamento crônico de ratos com amlodipina, um antihipertensivo antagonista de cálcio, interfere com o reparo ósseo alveolar. Ratos tratados com 0,04 mg amlodipina/rato/dia, via oral e ratos controles foram sacrificados em 1,2,3 e 6 semanas após a extração dos incisivos superiores direitos. As hemimaxilas foram processadas para inclusão em parafina e análise histométrica para avaliação da densidade volumétrica dos elementos reparacionais: coágulo e vasos sanguíneos, tecido conjuntivo e trabéculas ósseas. Os ratos tratados apresentaram diminuição de 20 a 30% na fração de volume de osso neoformado, a partir da segunda semana, ao lado de aumento de 17 a 32% na fração de volume de tecido conjuntivo e de 1-2 vezes no volume relativo de coágulo sanguíneo. Os autores concluíram que o uso crônico de amlodipina provocou retardo significativo na neoformação óssea reparacional após a extração dental associado a atraso na remissão/organização do coágulo sanguíneo.

Coutinho e Silva (2002) realizaram um estudo caso-controle para avaliar o papel do uso de um conjunto de medicamentos como fator de risco para quedas seguidas de fraturas entre idosos na cidade do Rio de Janeiro, Brasil. Cento e sessenta e nove casos de internação por fratura conseqüente a queda, e 315 controles hospitalares foram pareados por idade, sexo e hospital. Observou-se um aumento no risco desses acidentes para o uso de drogas bloqueadoras dos canais de cálcio (Odds Ratios = 1,96, 1,16-3,30) e benzodiazepínicos (OR = 2,09, 1,08-4,05), e uma redução para o uso de diuréticos (OR = 0,40, 0,20-0,80). Os autores

discutem que a possibilidade de ocorrer uma hipotensão pelo uso deste medicamento em idosos, seja o principal fator para o risco aumentado de quedas e conseqüente fratura. Os dados deste estudo apontam para a necessidade de ponderar os riscos e benefícios no uso de medicamentos em idosos, e orientar tais indivíduos e seus familiares para evitar esses acidentes quando o uso desses medicamentos é necessário.

Lynn et al. (2006) realizaram um estudo com 3887 pacientes chineses acima de 65 anos, tanto homens quanto mulheres, para explorar a associação entre o uso dos antihipertensivos inibidores da enzima conversora de angiotensina e a densidade mineral óssea. Informações quanto a dados demográficos, médicos e estilo de vida foram obtidos através de entrevista usando um questionário padronizado. No exame físico foram avaliados dados antropométricos, pressão sanguínea braquial e tibial, além da densidade óssea do colo do fêmur, espinha lombar e quadril total. Na análise de regressão múltipla, após ajuste para idade, peso, e altura, uso de drogas como tiazidas (diuréticos), beta-bloqueadores (antihipertensivos), bloqueadores dos canais de cálcio (antihipertensivos), estatina (tratamento de hipercolesterolemia), corticosteróide, e suplementação de cálcio, história de diabetes, doença do coração, doença vascular periférica, hábitos de fumar e consumir álcool, e nível de atividade física, foi observado que o uso dos antihipertensivos inibidores da enzima conversora de angiotensina esteve associado com uma maior densidade óssea do colo do fêmur em mulheres e com maior densidade óssea em todos os sítios avaliados (colo do fêmur, espinha lombar e quadril total) em homens. O uso de diuréticos tiazidas foi associado com maior densidade óssea em todos os três sítios em geral. Drogas bloqueadoras dos canais

de cálcio foram associadas com aumento da densidade óssea de forma significativa somente para a espinha lombar em mulheres. Os beta-bloqueadores não tiveram associação significativa com aumento da densidade óssea em qualquer sítio. Os autores concluíram que o uso associado de diuréticos tiazidas e de antihipertensivos inibidores da enzima conversora de angiotensina podem ter efeitos benéficos não somente no tratamento da hipertensão como também na osteoporose.

Wiens et al. (2006) através de uma meta-análise com 54 estudos caso-controle ou coorte, avaliaram a influência de drogas antihipertensivas no risco de fraturas ósseas em pessoas idosas. Cinco classes de medicamentos foram estudadas: diuréticos tiazidas, beta-bloqueadores, alfa-bloqueadores, inibidores da enzima conversora de angiotensina (IECA) e bloqueadores dos canais de cálcio. Os resultados desta meta-análise sugerem uma moderada redução no risco de fraturas ósseas entre os usuários de diuréticos tiazidas. Aparentemente, este efeito protetor dos diuréticos está limitado apenas aos tiazidas e apesar de compreender todos os tipos de fraturas, é mais intenso para as fraturas de quadril. Este efeito protetor pode ser explicado pela hipocalciúria (redução da eliminação de cálcio pela urina) e pelas evidências sugestivas do efeito direto em células osteoblásticas, aumentando a densidade óssea mineral. Os beta-bloqueadores, também mostraram ter efeitos protetores no risco de fraturas, especialmente para as fraturas de quadril. Porém, como apenas 8 estudos fizeram parte desta análise dos beta-bloqueadores, estudos adicionais são necessários. O uso dos alfa-bloqueadores parece não proteger contra fraturas. O único estudo disponível para os IECA mostrou efeito protetor para as fraturas, enquanto que o único estudo que avaliou os bloqueadores dos canais de cálcio concluiu que eles aumentaram o risco de fraturas do colo do fêmur. Os

autores concluíram que os diversos estudos sugerem que tanto os diuréticos tiazidas quanto os beta-bloqueadores, usados primariamente como antihipertensivos, podem conferir em benefício adicional na prevenção de fraturas osteoporóticas em pessoas idosas.

Halici et al. (2008) investigaram os efeitos de diferentes doses de amlodipina e laçadipina no conteúdo de cálcio e fósforo de fêmures de ratos ovariectomizados. O conteúdo de cálcio nos fêmures dos ratos ovariectomizados foi significativamente menor que no grupo controle após 8 semanas da cirurgia. No tratamento dos ratos ovariectomizados, tanto a amlodipina quanto a laçadipina, nas doses de 1 e 3 mg / Kg / dia, aumentaram significativamente as concentrações de cálcio e fósforo nos fêmures, comparado ao grupo controle (ovariectomizados sem medicação). Além disto, a amlodipina, em ambas as doses, aumentou significativamente as concentrações de cálcio e fósforo dos ratos ovariectomizados quando comparado aos ratos do grupo controle (não ovariectomizados). Foi concluído que a amlodipina e a laçadipina evitaram a perda óssea em um modelo de ratos osteopênicos induzidos por ovariectomia, sugerindo que estes potentes bloqueadores dos canais de cálcio tem efeitos benéficos no metabolismo ósseo.

2.3 Efeitos sobre os Osteoblastos

Guggino et al. (1989) demonstraram, através de um estudo *in vitro* com cultura de células ósseas de ratos, que os osteoblastos possuem canais de cálcio

sensíveis a ação de drogas agonistas e antagonistas dos canais de cálcio e concluiu que drogas que bloqueiam estes canais podem influenciar na osteoporose e outras disfunções ósseas. Evidências do papel destes canais no remodelamento ósseo em animais sadios partiram da observação de aumento da reabsorção óssea com a droga agonista BAY K 8644 e do potente bloqueio da reabsorção óssea pela droga antagonista verapamil.

Morain, Peglion e Giesen-Crouse (1992) observaram a presença de canais de cálcio tipo-L em células de osteossarcomas em ratos e afirmaram que estas células podem ser utilizadas em estudos sobre agentes que bloqueiam os canais de cálcio e de regulação hormonal do fluxo de cálcio através da membrana de osteoblastos.

Ritchie, Maercklein e Fitzpatrick (1994) realizaram um estudo para determinar se a redução significativa da reabsorção óssea realizada pelos osteoclastos, na presença de bloqueadores dos canais de cálcio, era mediada pelos próprios osteoclastos ou via osteoblastos. Não existiram alterações na diferenciação ou proliferação dos osteoblastos. Esta falta de efeitos dos bloqueadores dos canais de cálcio na diferenciação e crescimento dos osteoblastos na concentração usada para inibir a função dos osteoclastos sugere que os efeitos dos bloqueadores dos canais de cálcio nos osteoclastos não são mediados via osteoblastos. Estes dados indicam que os bloqueadores de canais de cálcio podem ligar-se aos canais de cálcio dos osteoclastos e fechá-los, levando a um aumento do cálcio extracelular, e consequentemente reduzir a reabsorção óssea.

Gu et al. (2001) afirmaram, por meio dos resultados de suas pesquisas, que tanto os osteoblastos, quanto as células osteoblastos-semelhantes e as células da medula óssea apresentaram canais de cálcio tipo-L e tipo-T. No presente estudo, observaram que hormônios reguladores da formação óssea induziram a expressão de canais de cálcio tipo-L subunidades α_{1c} e α_{1d} .

Nishiya e Sugimoto (2001) avaliaram os efeitos de várias drogas antihipertensivas na função dos osteoblastos. Para isto foi utilizado uma cultura de células clone dos osteoblastos. As drogas utilizadas no estudo foram os bloqueadores dos canais de cálcio tipo diidropiridinas (amlodipina, benidipina e nifedipina), inibidores da enzima conversora de angiotensina (ACE) (captopril, lisinopril e enalapril) e os antagonistas dos receptores tipo 1 de angiotensina II (AT1) (TCV 116 e KW-3433). Nenhum dos inibidores de ACE ou antagonistas AT1 afetaram significativamente a atividade de fosfatase alcalina ou conteúdo do DNA celular. Por outro lado, a amlodipina, benidipina e nifedipina, em diversas concentrações, afetaram a atividade de fosfatase alcalina. A benidipina aumentou significativamente a mineralização *in vitro* em várias concentrações empregadas, enquanto a amlodina apresentou este efeito somente numa alta concentração e a nifedipina não aumentou a mineralização *in vitro*. Comparando a concentração efetiva de cada bloqueador dos canais de cálcio neste estudo com a concentração sérica máxima já relatada para cada droga, concluiu-se que apenas a benidipina poderia promover a deposição mineral em humanos.

Nishiya et al. (2002) avaliaram a influência da benidipina, um potente bloqueador dos canais de cálcio tipo-L, em estimular a diferenciação osteoblástica,

assim como objetivaram identificar o mecanismo de ação da droga sobre os osteoblastos. Para isso usaram uma cultura de células osteoblásticas de camundongos. A benidipina induziu a atividade da fosfatase alcalina e a deposição mineral, porém não alterou a expressão de colágeno tipo I. Semelhante as células musculares lisas das artérias que apresentam os canais de cálcio tipo-L subunidade $\alpha 1C$, ponto principal da ação antihipertensiva dos bloqueadores dos canais de cálcio, as células osteoblásticas de camundongos também apresentam canais de cálcio tipo-L subunidade $\alpha 1C$ por todo o processo de diferenciação, desta forma o influxo do cálcio nesta célula foi fortemente atenuado na presença da benidipina. Outras 3 classes de bloqueadores dos canais de cálcio, estruturalmente diferentes, nifedipina, verapamil e diltiazem, também estimularam a atividade da fosfatase alcalina, porém em uma concentração extremamente mais elevada que a benidipina e com potência reduzida. Os resultados sugerem que a benidipina exerce efeitos diretos nos osteoblastos e promove a diferenciação osteoblástica após a fase de expressão de colágeno, através do bloqueio dos canais de cálcio tipo-L. A maior potência da benidipina em relação a amlodipina e a nifedipina em promover a diferenciação osteoblástica, pode ser pela forte afinidade e bloqueio dos canais de cálcio tipo-L, junto com sua habilidade de se manter na membrana por um período maior (longa duração de ação).

2.4 Efeitos Hormonais e reabsorção óssea

Almeida et al. (2000) estudaram os efeitos da amlodipina na função reprodutiva de ratos machos. Os ratos foram tratados com besilato de amlodipina 0,04mg por rato por dia, durante 30 dias. Os resultados mostraram uma redução plasmática do hormônio estimulador de folículos e da testosterona. Também ocorreu uma redução significativa na densidade de esperma (23%) e na maturação dos espermatozoides (14%). Concluiu-se que o uso crônico de amlodipina apresenta efeitos deletérios na função reprodutiva de ratos machos.

Pacotte, Ehrenstein e Fitzpatrick (1995) avaliaram a importância dos canais de cálcio na secreção hormonal da glândula paratireóide (PTH), pois existem evidências experimentais da presença destes canais nas membranas das células da glândula que respondem ao cálcio plasmático. A droga agonista (+) 202-791 aumentou a absorção do cálcio e reduziu a secreção de PTH, enquanto que seu enantiômero antagonista (-) 202-791 reduziu a absorção do cálcio e aumentou a secreção de PTH. Os resultados sugerem que os canais de cálcio fornecem um caminho para o movimento do cálcio através da membrana plasmática e que esta concentração de cálcio regula, pelo menos em parte, a secreção de PTH.

Gunness e Orwoll (1995) avaliaram as alterações precoces (até 4 semanas) que podem ocorrer sobre o osso cortical e esponjoso de ratos adultos submetidos à orquidectomia. Os resultados mostraram que a osteopenia iniciou por volta da segunda semana após orquidectomia. Houve uma redução significativa na

densidade óssea mineral do fêmur. O volume ósseo esponjoso vertebral e tibial diminuiu 19% e 13%, respectivamente, enquanto que a superfície dos osteoblastos e osteoclastos, e o número de osteoclastos aumentaram após orquidectomia. Em duas semanas pós-orquidectomia, houve um aumento na taxa de formação de osso esponjoso, que foi atribuído inicialmente a um aumento na superfície mineralisante e a um pequeno aumento na taxa de aposição mineral. Por outro lado, na cortical óssea externa a taxa de formação óssea e a superfície mineralisante diminuíram. Os autores concluíram que a orquidectomia estimula o turnover do osso esponjoso e reduz o turnover do osso cortical rapidamente, com conseqüente redução no volume ósseo e densidade mineral.

Orwoll (1998) afirmou que o hipogonadismo é um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de osteoporose nos homens.

Prakasam et al. (1999) avaliaram os efeitos do hormônio do crescimento e da testosterona na formação óssea cortical e na densidade óssea de ratos idosos orquidectomizados (ORX). A proposta foi testar se o uso combinado desses hormônios poderia aumentar a massa óssea em comparação com o uso individual. A análise histomorfométrica óssea da tíbia mostrou menor área de osso cortical no grupo orquidectomizado comparado ao grupo controle. A redução da área óssea cortical ocorreu devido à porosidade intracortical assim como redução na taxa de formação óssea periosteal. A administração de testosterona aos animais orquidectomizados preveniu o desenvolvimento da osteoporose e preveniu a redução da taxa de formação óssea. O conteúdo ósseo mineral e a densidade óssea mineral do fêmur, testado através da densitometria óssea, foi significativamente

maior no grupo com testosterona do que no grupo orquidectomizado, e igual ao controle. Por outro lado, o grupo com hormônio do crescimento apenas aumentou, de forma significativa, a taxa de formação óssea, não melhorando o conteúdo mineral ósseo e a densidade mineral óssea em relação ao grupo orquidectomizado. O estudo sugere que a testosterona e o hormônio do crescimento têm efeitos diferentes sobre a osteopenia de ratos idosos com deficiência de androgênios. O efeito positivo da combinação dos hormônios pode ser atribuído a prevenção da porosidade intracortical, e a um aumento na formação óssea periosteal e na massa óssea cortical.

Erben et al. (2000) realizaram um estudo com o objetivo de comprovar que o hipogonadismo, isto é, a deficiência de hormônios sexuais como a testosterona e o estradiol, é um importante fator de risco para o desenvolvimento de osteoporose em homens e mulheres, respectivamente. Os resultados deste estudo realizados em ratos orquidectomizados mostraram que a deficiência hormonal favorece uma importante perda óssea, especialmente de osso esponjoso, tanto no esqueleto axial quanto apendicular, e que esta osteopenia esteve associada a um aumento no *turnover* ósseo. O aumento no turnover ósseo foi representado por aumento no número de osteoclastos, superfície dos osteoblastos, taxa de formação óssea e sua frequência de ativação. Assim os efeitos esqueléticos da retirada dos hormônios sexuais andrógenos em ratos machos, parecem lembrar aqueles induzidos pela retirada dos hormônios sexuais estrógenos em ratas fêmeas.

Amadei et al. (2006) estudaram a influência da deficiência estrogênica no processo de remodelação e reparação óssea e concluíram que a diminuição dos

níveis de estrógeno altera tanto o processo de remodelação quanto o de reparação, embora nem todos os mecanismos estejam completamente elucidados. Em relação à reparação óssea, ainda não está determinado qual estágio é mais alterado pela deficiência estrogênica, se a fase inicial, se a fase de formação do calo ósseo, se a fase de mineralização ou, ainda, se a fase mais tardia da reparação, a remodelação óssea.

Pereira MC et al. (2007) investigaram os efeitos morfológicos da ausência de estrogênio sobre cicatrização alveolar de ratos jovens do sexo feminino após a extração dentária. Um total de 60 ratos (4 a 6 semanas de idade), do sexo feminino, foram submetidos a ovariectomia bilateral (OVX) ou não operados. Três semanas depois, os primeiros molares inferiores foram extraídos. Posteriormente, os animais foram mortos por deslocamento cervical 3, 5, 7, 14, 21, ou 28 dias após a extração dentária. As mandíbulas foram removidas, e cortes seriados transversais dos alvéolos dos primeiros molares inferiores foram obtidos para análise histométrica. Alvéolos OVX mostraram aumentos significativos de fibroblastos e colágeno de 3 a 5 dias após as extrações, seguidos de reduções significativas nestes parâmetros nos períodos subseqüentes. De acordo com a diminuição do teor de colágeno nos últimos períodos de cicatrização, neoformação óssea foi significativamente reduzida nos animais OVX. Esses resultados sugerem que as primeiras alterações moleculares observadas na ausência de estrogênio levaram a um atraso na cicatrização alveolar.

Yao et al. (2007) revelaram que a prolongada deficiência de estrógeno, reduz o volume do trabeculado ósseo, aumenta a força de compressão da micro arquitetura do osso e diminui o grau de mineralização.

Ikeo, Kamada e Goda (2007) afirmaram que a deficiência de estrógeno no período pós-menopausa causa redução na massa óssea do osso mandibular, assim como afeta a ossificação cartilaginosa do côndilo mandibular. Segundo os autores, embora o mecanismo de ação não esteja bem esclarecido, sabe-se que o estrógeno promove a morte celular programada dos osteoclastos, o que reduz seu período de atividade. Por outro lado, no período pós-menopausa, com a deficiência destes hormônios, os osteoclastos permanecem ativos por mais tempo que deveriam, provocando a osteoporose.

Reim et al. (2008) considerando que o hipogonadismo é um dos principais fatores de risco para osteoporose em homens, estudaram seqüencialmente os efeitos da deficiência androgênica em osso cortical de ratos idosos orquidectomizados (ORX). Cento e setenta ratos do sexo masculino com 13 meses de idade participaram do estudo como orquidectomizados ou controle. Após a marcação em vida com fluorcromo, os animais foram sacrificados em períodos de 2 semanas e 1, 2, 3, 4, 6 e 9 meses após a cirurgia. Para analisar os efeitos da reposição terapêutica da testosterona, ratos ORX havia 9 meses foram suplementados com testosterona em uma dose semanal de 6 mg / kg durante 4 meses. Mudanças no osso cortical da tíbia foram monitorados por análise pQCT e pela histomorfometria óssea. Os ratos do grupo controle não mostraram perdas ósseas relacionadas com o envelhecimento na diáfise tibial. A análise pQCT e

histomorfometria óssea mostrou osteopenia da cortical óssea em ratos ORX, começando a partir de 2 meses após a cirurgia, até ao final do estudo. A deficiência de andrógeno induziu a uma diminuição permanente na formação óssea periosteal durante os primeiros 4 meses após ORX. No entanto, embora a expansão periosteal da tíbia tendeu a ser mais lenta em ratos ORX, comparado ao grupo controle, a redução na área total óssea nos animais ORX, em corte transversal, alcançou significância estatística apenas após 4 meses da cirurgia. O principal mecanismo de perda óssea cortical em ratos ORX foi uma progressiva expansão da cavidade medular, que foi associado com um aumento inicial no perímetro interno endocortical em 1 e 2 meses após a cirurgia, seguida por um aumento sustentado na formação óssea endocortical até o final do estudo. Todas essas mudanças foram impedidas em ratos ORX recebendo suplementação de testosterona. Os autores concluíram que a perda óssea cortical induzida pela deficiência de andrógeno em ratos idosos, é causada principalmente pela remodelação óssea aumentada endocortical.

2.5 Reparação Óssea Controle

Granstrom e Nilsson (1987) desenvolveram um modelo de fratura mandibular em ratos com objetivo de avaliar a reparação óssea. Foi observado, através de análise histológica, que o reparo ósseo teve início por exuberante formação de osso trabecular a partir do periósteo e dos espaços medulares. A estabilidade da fratura em reparação foi vista após 14 a 16 dias, quando o osso trabecular atravessou todo o defeito da fratura unindo os dois cotos. Os autores

concluíram que a reparação óssea da fratura mandibular em ratos se deu tanto por formação direta de osso trabecular quanto via formação de tecido cartilaginoso, que posteriormente foi reabsorvido e substituído por osso.

Carvalho, Bombonato e Brentegani (1997) analisaram a cronologia do reparo ósseo alveolar em ratos normais. Os incisivos superiores direito foram extraídos e os animais sacrificados nos períodos de 1, 2, 3 e 6 semanas de pós-operatório. A progressiva neoformação óssea e a redução na porcentagem de tecido de granulação foi quantificada nos terços apical, médio e cervical através de análise volumétrica histológica. O terço cervical do alvéolo apresentou em todos os períodos, menos na sexta semana, uma quantidade significativamente menor de osso trabecular comparado aos terços médio e apical. Os dados histométricos mostram que a reparação óssea de alvéolos continua além da 3ª semana pós-operatória.

Rabeque et al. (2002) avaliaram a resposta tecidual diante de um defeito ósseo cirúrgico vertical simulando fratura no ramo mandibular de ratos adultos. Foi realizada osteotomia linear bicortical no ramo mandibular do lado direito, sob anestesia geral. Foi utilizada broca em baixa rotação, sob irrigação. Os animais foram sacrificados após 24 horas, sete dias, quinze dias, um mês e três meses. O exame radiográfico das hemimandíbulas mostrou um preenchimento progressivo de defeito ósseo. Os dados histológicos mostraram, inicialmente, processo inflamatório agudo. Após 7 dias, áreas extensas de neoformação cartilaginosa e óssea sobre as corticais externas, bem como tecido de granulação no sítio do defeito, foram observadas. Após um mês, o osso neoformado a partir das corticais externas preenchia, em parte, o sítio do defeito. Após 3 meses, o local estava preenchido por

tecido ósseo remodelado, exceto na borda inferior, onde havia tecido fibroso e adiposo. Os autores concluíram que a resposta tecidual frente a defeito cirúrgico no ramo da mandíbula de ratos consiste em exuberante neoformação óssea, havendo um preenchimento parcial do mesmo.

Rodrigues, Miyazaki e Luz (2004) estudaram as conseqüências no crescimento da maxila e mandíbula, de um defeito ósseo cirúrgico no ramo da mandíbula de ratos simulando fratura. Foram utilizados 25 ratos Wistar com um mês de idade. Sob anestesia geral e por meio de incisão submandibular, foi realizada osteotomia vertical no ramo da mandíbula do lado direito com emprego de motor cirúrgico. Após o período de dois meses os animais foram sacrificados, os tecidos moles retirados e as hemimandíbulas desarticuladas. Foram realizadas incidências radiográficas axiais para crânio e laterais para as hemimandíbulas, a seguir, por intermédio de um sistema de computador foram obtidas medidas lineares da maxila e das hemimandíbulas. Utilizaramo teste “t” de Student para verificação da significância da diferença entre os lados experimental e controle. Seus resultados mostraram que a diferença foi significativa para a altura do ramo e o comprimento da mandíbula referente ao côndilo e ao ângulo, não havendo diferença significativa para as mensurações da maxila. Os autores concluíram que o defeito ósseo cirúrgico experimental no ramo da mandíbula na fase de crescimento provocou uma diminuição da altura do ramo e do comprimento da mandíbula.

Douglas (2006) afirmou que a resposta adaptativa do osso perante os agentes agressores se expressa basicamente pela instalação de um processo inflamatório, reatividade celular proeminente e a formação de um calo ósseo como

fenômeno reparatório fundamental. O autor descreveu os estágios evolutivos da reparação de uma fratura óssea de origem mecânica. Inicialmente a fratura produz sangramento que extravasa e impregna o osso, seguida da hemostasia. O coágulo sanguíneo serve de guia ao processo reativo para a formação do tecido de granulação, contendo fibroblastos, células endoteliais e macrófagos, todos ativados principalmente pelos fatores de crescimento. Posteriormente ocorre invasão de elementos celulares próprios do osso, primeiramente condrogênicos seguidos de osteogênicos e condroclásticos. Os elementos gênicos derivam do periósteo e endósteo e os clásticos dos monócitos sanguíneos. Desta forma, todo o tecido formado inicialmente é do tipo cartilagíneo ou fibrocartilagíneo e este envolve a área da fratura, constituindo a condroificação do calo. Determinou-se que a formação de cartilagem nessa fase da evolução do calo ósseo é influenciada pela tensão de oxigênio, pois a reduzida pressão de oxigênio no sangue arterial estabelece uma acentuação na condrogênese. Deve-se especificar que, nos ossos chatos, em geral, como é o caso da mandíbula, o calo formado é preponderantemente fibromembranáceo, e não tanto fibrocartilagíneo, como sucede em outros ossos. À medida que o calo progride, ocorre sua calcificação, e gradualmente a cartilagem começa a ser substituída por osso trabecular, constituído por abundantes trabéculas e espaços medulares amplos entre elas. Concomitantemente ao processo osteogênico, os macrófagos afluentes iniciam uma fase de remoção do calo, agindo obviamente como osteoclastos. Sendo assim, o traço de fratura vai sendo reabsorvido, à medida que se forma novo tecido. A presença de osso trabecular parece ser importante, pois ao deixar amplos espaços vasculares, ocorre preenchimento destes por crescimento aposicional, de modo a constituir osso compacto, já similar ao osso maduro. Segue um processo de remodelação com

formação de um osso compacto e com baixo fluxo sanguíneo, com o intuito de adaptá-lo as necessidades tensionais mecânicas a que é submetido, chamado osso maduro.

Flach et al. (2008) revisando a literatura discorreram sobre a regeneração óssea em fraturas de cães e gatos. Relataram que inicialmente há uma formação de hematoma, não é apenas um coágulo inerte, mas sim uma miscelânea de mediadores químicos capazes de estimular a formação do calo ósseo para unir a fratura. A coagulação ativa o sistema complemento, atrai células inflamatórias, macrófagos, síntese e liberação de prostaglandinas. As plaquetas, são ricas em fatores de crescimento, estimulam a mitose e a diferenciação de células mesenquimais. A fibrina no coágulo age como um suporte temporário para as células mesenquimais e vasos sanguíneos. Durante as primeiras 48 horas após a ocorrência das fraturas não há estabilidade ou produção de osso novo. O estágio da Inflamação começa imediatamente após a ocorrência da fratura e persiste até que a formação de cartilagem ou de osso seja iniciada, em 3 a 4 dias. Expressiva vasodilatação, hiperemia, exsudato inflamatório composto por células e plasma adiciona-se ao coágulo sanguíneo inicial. Havendo diminuição à nutrição nas extremidades do osso fraturado ocorre hipóxia, tornando-as necróticas, com degeneração dos osteócitos, 2 a 4 dias, um milímetro ou mais de distância das extremidades ósseas. Este processo de remoção do tecido necrosado feito pelos macrófagos continua por dias a semanas. Na fase de reparação ou estágio de Indução, há uma teoria que diz, que as células do periósteo e do endósteo passam por uma modulação para produzir novos osteoblastos, a atividade proliferativa ocorre através do periósteo do osso lesado e não exatamente no local da fratura, com a habilidade de gerar não apenas osteoblastos, mas também condroblastos e

fibroblastos. No estágio de calo mole, a porção do calo proveniente do perióstio é denominada calo externo e a parcela proveniente do endóstio recebe o nome de calo interno. Entre a primeira e a segunda semana, o calo externo está apto a unir o espaço deixado pelas extremidades da fratura com o osso formado. A formação de um calo externo ocorre por uma proliferação ativa de osteoblastos da camada de câmbio do perióstio. Na porção proximal do perióstio, os osteoblastos formam um novo osso diretamente. Entretanto, à medida que o sítio da fratura é aproximado, células de cartilagem e osteoblastos ativos tornam-se evidentes. Quando maduro, o calo fibrocartilaginoso consiste de uma massa translúcida de um tecido fibroso denso, fibrocartilagem e cartilagem. A cartilagem aparece em nódulos separados irregularmente por bandas de fibrocartilagem. Após 3 semanas de fratura, o calo assume grosseiramente a forma de cunha com o septo fibroso convergindo para no meio do traço da fratura. Este septo carrega vasos que se originam do perióstio reparado e da circulação medular. Quando o suprimento de oxigênio ao calo é baixo, uma maior quantidade de cartilagem tende a ser formada. Considera-se alguma cartilagem hialina no calo como normal. Na maioria das fraturas, a cartilagem está usualmente presente na periferia da região mais espessa do calo. A cartilagem hialina de um calo eventualmente pode sofrer mineralização e subsequente ossificação endocondral. Estágio de calo rígido. Durante este estágio, os calos externo e interno (ou medular) gradualmente são convertidos a osso. Com o suprimento vascular aumentado, aumenta a tensão de oxigênio aos tecidos e o calo ósseo completo deve ser formado em aproximadamente 6 semanas quando os componentes fibrocartilaginosos do calo calcificam. Então osteoclastos, começam a modelar o sítio da fratura, fase de remodelação. O osso fibroso recém formado é

gradualmente convertido a osso lamelar. Os canais de Havers são formados durante a remodelagem. Quanto menos estável for a fratura, maior será o calo.

Aguiar (2008) avaliou o efeito do quimioterápico metotrexato, na reparação de fraturas mandibulares, num modelo experimental em ratos. O modelo experimental consistiu na criação de um defeito ósseo vertical no ângulo/ramo da mandíbula do rato, e a reparação óssea foi verificada nos tempos de 1, 7, 15 e 30 dias após a cirurgia. As mandíbulas foram submetidas a exame radiográfico e histológico. Os resultados histológicos revelaram inicialmente, no grupo controle, predomínio de exsudato neutrofílico e serofibrinoso no interior e ao redor do defeito. Aos 7 dias se observou as margens do defeito desvitalizadas e com sinais de reabsorção, assim como neoformação óssea junto as corticais externas e algumas áreas de tecido cartilaginoso. Aos 15 dias visualizou-se osso neoformado em processo de maturação a partir do periósteo, e presença de tecido cartilaginoso bem definido entremeado. Aos 30 dias observou-se extensa área de neoformação óssea com tendência ao fechamento do defeito e áreas focais de tecido cartilaginoso dispersas pelas trabéculas ósseas neoformadas. O grupo experimental com alta dose de metotrexato apresentou redução significativa na quantidade de tecido cartilaginoso e atraso significativo na neoformação óssea, resultando em menor grau de fechamento do defeito. O autor afirmou que o modelo experimental que simula uma fratura mandibular em ratos é útil para estudar o processo de reparação óssea, e concluiu que o medicamento metotrexato utilizado em alta dose afeta desfavoravelmente este processo comparado ao grupo controle em ratos.

2.6 Dosagens

Kanno et al. (1996) avaliaram os efeitos na pressão arterial e na proteção renal produzidos pelo uso combinado de amlodipina (bloqueador dos canais de cálcio) e enalapril (inibidor da enzima conversora de angiotensina) em ratos espontaneamente hipertensos, comparando com o uso monoterápico destas drogas. Foi utilizada a dosagem de 0,02 mg / 100 mg / dia na monoterapia, e as dosagens de 0,01 mg / 100 mg / dia ou 0,02 mg / 100 mg / dia na terapia combinada, para ambos os medicamentos. Na monoterapia, tanto a amlodipina, quanto o enalapril reduziram significativamente a pressão arterial e a excreção de proteínas na urina, porém o uso combinado das drogas não obteve efeitos adicionais.

Takahashi et al. (1996) avaliaram os efeitos da amlodipina no desenvolvimento da hipertrofia ventricular e espessura das artérias pulmonares em ratos com hipertensão pulmonar induzida. Foi utilizada amlodipina por via oral nas dosagens de 0,3, 1 e 3 mg / 100 mg / dia. Os animais tratados com a dose de 3 mg / 100 mg / dia de amlodipina apresentou uma redução significativa em todos os parâmetros avaliados quando comparado aos animais com hipertensão pulmonar não medicados. A pressão arterial reduziu significativamente com o aumento da dose de amlodipina de 1 mg para 3 mg / 100mg / dia.

Teófilo, Brentegani e Lamano Carvalho (2001) utilizaram a dose de 0,04 mg de amlodipina / rato / dia, via oral, para investigar se o uso crônico deste antihipertensivo antagonista de cálcio, interfere com o reparo ósseo alveolar. Os

autores concluíram que o uso crônico de amlodipina provocou retardo significativo na neoformação óssea reparacional após a extração dental associado a atraso na remissão/organização do coágulo sanguíneo.

2.7 Hipertensão arterial sistêmica e metabolismo ósseo

Wang et al. (1993) compararam as possíveis alterações histomorfométricas presentes em tíbias de ratos espontaneamente hipertensos com ratos Wistar normotensos. Foi observada, nos ratos hipertensos, uma redução no peso corporal, no volume ósseo trabecular, no número e espessura das trabéculas, no número de osteoblastos e células osteoprogenitoras e na taxa de formação óssea, quando comparada aos ratos normotensos. Por lado, os ratos hipertensos apresentaram o número de osteoclastos e a pressão sanguínea significativamente aumentados. Assim, os autores concluíram que a atividade osteoclástica é dominante sobre a atividade osteoblástica e condroblástica nos ratos hipertensos, o que resulta em menor volume de osso trabecular no esqueleto. Foi citado como possíveis causas para estes resultados a elevada produção do paratormônio (PTH), a baixa absorção do cálcio, a redução no peso corporal reduzindo a sobrecarga no osso e possíveis alterações celulares diretas. Porém, novos estudos são necessários para confirmar estes possíveis fatores.

Morel e Godfraind (1994) utilizaram da amlodipina de forma crônica, a por via oral, na dosagem de 1 mg / 100 mg / dia, em ratos espontaneamente hipertensos

e em ratos normotensos Wistar com o objetivo avaliar seu mecanismo de ação. A hipertensão foi significativamente reduzida nos ratos espontaneamente hipertensos, porém não alterou a pressão sanguínea nos ratos normotensos Wistar. O efeito funcional do tratamento esteve relacionado à ocupação de sítios de ligação dihidropiridinas nas artérias, porém a maior potência da amlodipina nas artérias dos ratos espontaneamente hipertensos pode ter relação com a sua maior afinidade aos canais de cálcio destes animais.

Tsuda, Nishio e Masuyama (2001) realizaram um estudo para avaliar a influência da hipertensão arterial na densidade mineral óssea. A análise densitométrica do osso mostrou uma redução significativa da densidade óssea em mulheres com hipertensão arterial comparada a mulheres não hipertensas. A densidade óssea foi inversamente proporcional a pressão arterial sistólica. A excreção de cálcio na urina foi significativamente maior nas hipertensas. Os autores concluíram que a hipertensão arterial pode ter relação com a redução na densidade mineral óssea em mulheres hipertensas.

Pérez-Castrillón et al. (2003) avaliaram a massa óssea e os marcadores de remodelamento ósseo em mulheres hipertensas pós-menopausa. Amostras de sangue e urina foram analisadas para os parâmetros relacionados ao metabolismo do cálcio. Mulheres que apresentavam hipertensão associada a osteoporose apresentaram maiores níveis de calciúria comparadas as mulheres com hipertensão não-osteoporóticas. Nenhuma relação foi vista entre pressão sanguínea sistólica e diastólica com a massa óssea.

Gotoh et al. (2005) avaliaram a influência da pressão sanguínea alta na perda óssea em mulheres. A densidade mineral óssea foi significativamente menor em mulheres hipertensas quando comparado a mulheres normotensas, apresentando uma correlação inversamente proporcional com a pressão sanguínea sistólica. A taxa de excreção de cálcio e sódio na urina foi significativamente maior nas mulheres hipertensas. Houve uma relação inversa da taxa de excreção do cálcio e sódio com a densidade óssea. Os níveis plasmáticos do paratormônio foram maiores, enquanto que os níveis de cálcio iônico sérico foram menores para as mulheres hipertensas. Foi concluído que a hipertensão arterial esteve associada com anormalidades no metabolismo do cálcio e conseqüente redução na densidade mineral óssea.

Pereira AC et al. (2007) realizaram um estudo com ratos hipertensos e normotensos comparando a porcentagem das áreas cortical, trabecular e do canal medular do fêmur. Os resultados mostraram que o valor de porcentagem do canal medular foi maior nos ratos hipertensos, enquanto que as áreas cortical e trabecular foram menores. Os resultados deste estudo permitiram concluir que os animais hipertensos apresentaram aumento da porcentagem do canal medular em consequência da redução dos ossos cortical e trabecular. Os autores afirmaram que os hipertensos apresentam um aumento na taxa de reabsorção óssea, com possível relação no aumento do número de osteoclastos e na alteração do metabolismo do cálcio.

2.8 Análises bioquímicas da atividade óssea

Fini et al. (2004) realizaram uma revisão da literatura sobre as características e a capacidade regenerativa de ossos osteoporóticos e ossos normais, frente a implantação de biomateriais. Esta alteração óssea tem grande incidência na população idosa devendo ser o foco de pesquisas. Segundo os autores, a osteoporose tem influências negativas no processo de reparo de uma fratura. Neste caso, a conseqüente redução na produção de fosfatase alcalina, provoca uma menor resposta ao estímulo mitogênico, assim como uma reduzida capacidade de diferenciação de osteoblastos maduros.

Leite (2005) realizou um estudo do efeito do ultra-som no tratamento de fratura de fíbula de ratos. Segundo a autora, os níveis de fosfatase alcalina e cálcio séricos foram avaliados, pois estes poderiam determinar a taxa de formação óssea. O aumento da atividade de fosfatase alcalina no processo de reparo de uma fratura óssea deveria favorecer a deposição de cálcio no tecido ósseo e conseqüentemente diminuir sua concentração no plasma sanguíneo. Foi observado que no grupo controle (fraturado, porém sem uso do ultra-som) os níveis de cálcio e fosfatase alcalina permaneceram equivalentes ao grupo de referência (sem fratura), quando analisados no sétimo dia após a fratura induzida. Quando analisado no décimo quarto dia após a lesão, o grupo controle apresentou valores de fosfatase alcalina elevados, enquanto os valores de cálcio estavam abaixo do valor de referência. No vigésimo primeiro dia após a fratura, os níveis de cálcio voltaram aos valores de referência e os de fosfatase alcalina permaneceram um pouco acima do valor de

referência. Nos animais tratados com ultra-som, quando analisados no sétimo dia após a fratura induzida, apresentaram níveis de fosfatase alcalina e cálcio séricos abaixo do valor de referência. No décimo quarto dia, os níveis de fosfatase alcalina estão acima do valor de referência, mas abaixo do valor médio do grupo controle e o cálcio próximo do valor de referência. Segundo a autora, os grupos tratados com ultra-som voltaram aos níveis basais mais rapidamente do que o grupo controle, sugerindo que o ultra-som pode modular os níveis de fosfatase alcalina e cálcio séricos, acelerando o processo de consolidação óssea.

Ferreira Júnior et al. (2008) avaliaram os efeitos de bisfosfonatos e estatinas na reparação de fraturas em tíbias de ratos com osteoporose induzida com dexametasona. Os efeitos desses fármacos foram avaliados pelos marcadores bioquímicos cálcio, fósforo, albumina, proteínas totais, fosfatase alcalina e exame histomorfométrico de densidade trabecular óssea. Além disso, foi realizada morfometria através das medidas de comprimento, espessura, diâmetro do calo ósseo e densidade das tíbias dos animais. Os resultados bioquímicos não apresentaram diferenças significativas. Através da morfometria e histomorfometria foi possível constatar a indução da osteoporose com o glicocorticóide, assim como a melhoria na densidade óssea, densidade trabecular óssea e diâmetro do calo ósseo em todos os grupos tratados. Estas técnicas mostraram que a recuperação óssea foi equiparável ao do grupo normal, demonstrando que os fármacos testados são eficazes em animais osteoporóticos submetidos à fratura, ressaltando que os melhores efeitos foram obtidos com o alendronato.

3 PROPOSIÇÃO

A proposta deste estudo foi avaliar, de forma radiográfica e histológica, o efeito do bloqueador de canais de cálcio amlodipina no processo de reparo de um defeito cirúrgico simulando fratura no ramo mandibular de ratos, assim como verificar as alterações nos níveis de fosfatase alcalina e cálcio séricos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Neste estudo foram utilizados 50 ratos machos, com 3 meses de idade e com média de 250 gramas de peso corporal (Rattus norvegicus, Wistar), que foram divididos em 25 ratos para o grupo experimental e 25 ratos para o grupo controle. Todos os animais foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico para confecção de um defeito ósseo vertical no ramo mandibular unilateral, simulando fratura (Figura 4.1).

Figura 4.1 – Desenho esquemático do modelo experimental. Defeito ósseo cirúrgico em ramo mandibular de rato

No grupo experimental, os animais receberam doses orais diárias (0,04 mg/ 0,5 ml / rato) de solução aquosa de besilato de amlodipina (Farmavital – Farmácia de Manipulação, Homeopatia e Fórmulas Magistrais – São Paulo/SP) (Figuras 4.2). A administração do medicamento teve início doze dias antes do procedimento cirúrgico

e continuou até o dia do sacrifício. O grupo controle não recebeu o medicamento Amlodipina.

Figura 4.2 – Forma de apresentação do medicamento utilizado no estudo. Frascos de 100 ml

Todos os animais foram alimentados com ração granulada para roedores (Labina, Agribands Purina) e água *ad libitum*. O manuseio dos animais foi de acordo com os princípios éticos propostos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). O estudo foi realizado no Laboratório Experimental do Departamento de Cirurgia, Prótese e Traumatologia Maxilo Faciais da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Os animais foram obtidos do biotério da Faculdade de Farmácia da Universidade de São Paulo e mantidos no biotério do Departamento de Cirurgia, Prótese e Traumatologia Maxilo Faciais da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo. O biotério em que foram mantidos os animais é apropriado para a manutenção pós-operatória, pois é livre de ruídos e conta com exaustão/troca de ar constante, com temperatura de 21° C, com períodos iguais de

exposição à luz e de escuridão sempre no mesmo horário, sendo mantidos cinco animais no máximo por gaiola, com emprego de maravalha estéril.

Os animais do grupo experimental receberam doses orais diárias (0,04 mg/rato) de amlodipina, por intubação gástrica (gavagem), diluídos em 0,5 ml de água destilada como veículo, por meio de uma cânula metálica de gavagem para ratos acoplada a uma seringa plástica de 5 ml.. Com a contenção do rato, a cânula foi inserida delicadamente através da cavidade oral e o conteúdo líquido da seringa foi aplicado (Figura 4.3). Este procedimento foi executado com rapidez e precisão, evitando desconforto para o animal.

Figura 4.3 – Administração oral de amlodipina. A e B – Técnica para apreensão do rato; C – Intubação gástrica (gavagem) com uma cânula metálica de gavagem para ratos, acoplada a uma seringa plástica de 5 ml utilizada na administração do medicamento

No 13º dia de administração do medicamento, os animais do grupo experimental foram submetidos à intervenção cirúrgica, sob anestesia geral. Inicialmente, foi aplicado xilazina (Rompum, Bayer), na dose de 10 mg / Kg de peso corporal, e a anestesia geral foi induzida por cloridrato de quetamina (Francotar, Virbac), na dose de 10 mg/100 g de peso corpóreo, ambos aplicados via intraperitoneal.

Após anestesia geral, foi realizada tricotomia submandibular próxima ao ângulo da mandíbula no lado direito, seguida da anti-sepsia com polivinilpirrolidona-iodado e

colocação de campo fenestrado estéril sobre os animais (Figura 4.4 – A). Uma incisão linear de aproximadamente 1,5 cm foi feita na região submandibular direita com o uso de uma lâmina de bisturi número 15 (Figura 4.4 – B). Através de divulsão da massa muscular e incisão acompanhada do deslocamento do periósteo, a superfície óssea foi exposta (Figura 4.4 – C), permitindo que um defeito cirúrgico vertical e bicortical no ramo da mandíbula fosse realizado (Figura 4.4 – D). O defeito foi criado por motor de baixa rotação e broca número 701 de carbide sob irrigação abundante de soro fisiológico. O procedimento foi concluído através de sutura por planos com fio de *nylon* monofilamento 5-0 (Figura 4.4 – E,F). Ao final da cirurgia foi aplicada benzilpenicilina benzatina (Benzetacil, Fontoura-Wyeth), na dose fixa de 16.000 U.I. via intraperitoneal.

Figura 4.4 – Imagens transoperatórias da confecção do defeito ósseo vertical no ramo mandibular do rato. A – Tricotomia submandibular; B – Incisão submandibular; C – Acesso ao ramo mandibular; D – Defeito ósseo vertical; E – Sutura do plano muscular; F – Sutura da pele

Após a cirurgia, os animais permaneceram alojados em gaiolas adequadas, onde receberam ração granulada para roedores (Labina, Purina), fragmentada nos primeiros 15 dias, e na forma normal no período restante.

Tanto os animais do grupo experimental quanto os animais do grupo controle foram sacrificados por dose letal de anestésico geral, em períodos de 1, 7, 14, 30 e 90 dias pós-operatórios, com cinco animais em cada período.

No dia do sacrifício, após a realização da anestesia geral, foram colhidas amostras de sangue (3 ml) dos animais, feita por punção cardíaca, para realização de análises bioquímicas da fosfatase alcalina e cálcio séricos. Os testes bioquímicos foram realizados por processamento manual. O sangue coletado foi introduzido em tubo vácuo seco e submetido à centrifugação (Coleman, mod. 90-1) a 300rpm durante 10 minutos. O soro obtido foi então retirado com uma pipeta, inserido em tubo Eppendorf e estocado em geladeira sob -7°C. O material foi submetido à reação com os respectivos kits de reagentes e padrão (Labtest® São Paulo, Brasil), de acordo com as normas estipuladas pelo fabricante. A quantificação da reação foi feita em espectrofotômetro (Coleman, mod. 35D) previamente calibrado. Um período prévio de calibração para as amostras dos animais foi necessário. Os valores de referência dos testes bioquímicos de sangue dos animais foram obtidos pelos valores do controle negativo e os relatados por Mitruka e Rawnsley em 1977, (Anexo A).

Após o sacrifício, a mandíbula foi removida preservando a massa muscular ao redor do ângulo e ramo e fixada em formol tamponado a 10%. A hemimandíbula operada foi submetida a exame radiográfico por meio de incidência em norma lateral, com emprego de aparelho de raios X odontológico (Spectro II, Dabi-Atlante, Ribeirão Preto, Brasil), no regime de 56Kv, 10mA, 0,4 segundos e filme do tipo periapical (Kodak-Ektaspeed, Eastman Kodak Co, EUA), sendo mantida uma distância focal de 40 centímetros. As radiografias foram então fotografadas por câmera digital (Sony, Cyber-shot, Super Steady Shot, DSC-W80, Sony Corp, China),

em câmara escura e uso de netagoscópio, e as imagens analisadas em microcomputador IBM-PC (International Business Machines corporation, EUA), pelo software ImageLab 2000 (Softium Informática, São Paulo, Brasil), localizado no Laboratório de Informática Dedicado à Odontologia (LIDO) da FOUSP, onde se mediu a área radiolúcida entre as margens do defeito, em unidade de milímetros (Figura 4.5).

Figura 4.5 – Imagem obtida do monitor do computador, demonstrando a medição da área radiolúcida do defeito ósseo no programa ImageLab 2000

Posteriormente, a peça foi descalcificada em ácido fórmico a 20% por uma semana. Procedimentos usuais de laboratório foram utilizados para obtenção dos cortes histológicos semi-seriados de 7 μ m e examinados sob microscopia óptica de luz. Foram realizados 50 cortes histológicos das mandíbulas dos ratos, no

sentido horizontal ou perpendicular à linha de osteotomia do defeito ósseo (Figura 6), e corados com hematoxilina – eosina (HE) com o objetivo de realizar uma leitura generalizada das estruturas observadas na lâmina. Também foram realizados 50 cortes histológicos, no mesmo sentido, e corados com azul de toluidina, com o objetivo específico de observar a possível presença de cartilagem em meio à reparação do defeito ósseo. Foram avaliados sob microscopia óptica de luz, de forma descritiva, os seguintes parâmetros, no interior do defeito ósseo: exsudato neutrofílico, exsudato serofibrinoso, infiltrado linfo-plasmocitário, tecido de granulação, proliferação cartilaginosa e neoformação óssea. Também foram verificados nas margens do defeito ósseo: osso viável, osso necrótico, reabsorção óssea, proliferação cartilaginosa e neoformação óssea.

Realizou-se análise histomorfométrica das lâminas coradas com HE e aumento de 40X, dos animais sacrificados nos períodos de 7, 14 e 30 dias. Foram observadas e medidas as áreas de osso neoformado, em milímetros, a partir das corticais externas da mandíbula por toda a lâmina. O sistema usado na captação das imagens consistiu de uma câmera adaptada a um microscópio que fez a transferência das imagens ao monitor Sony Trinitron (Sony Co., Japão) do microcomputador IBM-PC (International Business Machines corporation, EUA) e então foram gravadas e analisadas pelo software ImageLab 2000. As áreas de osso neoformado foram identificadas em aumento de 40X.

Figura 4.6 – Desenho esquemático de mandíbula de rato demonstrando o defeito ósseo cirúrgico e o posicionamento do corte histológico

4.1 Análise Estatística

As análises estatísticas foram utilizadas para os seguintes resultados: medidas das áreas radiolúcidas observadas nas radiografias, medidas de osso neoformado observado no estudo histomorfométrico e para os níveis de fosfatase alcalina e cálcio séricos encontrados na análise bioquímica. Para a descrição e comparação entre os períodos, dentro de cada grupo, foi aplicado o Teste de Kruskal-Wallis, seguido do Teste de Mann-Whitney, somente nos casos de diferenças estatisticamente significante. Para descrição e comparação entre os grupos, nos períodos correspondentes, foi aplicado o Teste de Mann-Whitney. Para a aplicação dos testes estatísticos, foi adotado o nível de significância de 5% ($p < 0,050$).

4.2 Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

O projeto de pesquisa foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, Protocolo número 11/07 (Anexo B).

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação Radiográfica descritiva

O exame radiográfico revelou uma visão ampla de toda extensão do defeito, evidenciando homogeneidade inicial da osteotomia, seguida por áreas de reabsorção e neoformação óssea durante as fases do experimento, confirmando uma adequada padronização do ato cirúrgico e valorizando este modelo de cirurgia experimental.

A avaliação radiográfica descritiva das hemimandíbulas revelou que:

Período de 1 dia. Tanto para o grupo controle quanto experimental, as margens ósseas das osteotomias apresentavam-se bem definidas e o defeito ósseo como uma faixa radiolúcida (Figura 5.1).

Figura 5.1 – Imagem radiográfica de uma hemimandíbula no período de 1 dia. Seta indicando imagem radiolúcida correspondente ao defeito ósseo mandibular

Período de 7 dias. No grupo controle, as margens das osteotomias eram irregulares, com áreas sugestivas de reabsorção aumentando a largura do defeito ósseo mandibular (Figura 5.2 - A); no grupo experimental, as margens das osteotomias eram bem definidas, com discretos sinais de reabsorção e o defeito ósseo radiolúcido ainda uniforme (Figura 5.2 - B).

Figura 5.2 – Imagens radiográficas das hemimandíbulas no período de 7 dias. A - Grupo controle; B – Grupo experimental

Período de 14 dias. No grupo controle, as margens das osteotomias eram mal definidas e borradas, com aumento da radiopacidade a partir das bordas do defeito ósseo, invadindo a faixa radiolúcida, estreitando-a (Figura 5.3 - A); no grupo

experimental, as margens das osteotomias eram irregulares, com áreas sugestivas de reabsorção, e o defeito ósseo com discreto aumento da radiopacidade (Figura 5.3 - B).

Figura 5.3 – Imagens radiográficas das hemimandíbulas no período de 14 dias. A - Grupo controle; B – Grupo experimental

Período de 30 dias. No grupo controle, havia muita semelhança com o período de 14 dias deste grupo, porém com aumento na radiopacidade (Figura 5.4 - A); no grupo experimental, havia sinais de reabsorção óssea bastante significativa nas

margens do defeito, e em seu interior, discreto ganho da radiopacidade comparado ao período anterior deste grupo (Figura 5.4 - B).

Figura 5.4 – Imagens radiográficas das hemimandíbulas no período de 30 dias. A - Grupo controle; B – Grupo experimental

Período de 90 dias. No grupo controle, observou-se a área do defeito ósseo de forma nítida, porém com radiopacidade homogênea e tendência ao fechamento completo do defeito ósseo (Figura 5.5 - A); no grupo experimental, havia preenchimento parcial do defeito ósseo com aspecto radiopaco, com algumas áreas de rarefação radiográfica, sugestivas de reabsorção óssea em suas margens (Figura 5.5 - B).

Figura 5.5 – Imagens radiográficas das hemimandíbulas no período de 90 dias. A - Grupo controle; B – Grupo experimental

5.2 Avaliação radiográfica objetiva

As medidas das áreas radiolúcidas observadas no interior do defeito ósseo, por meio do software ImageLab 2000, revelaram inicialmente áreas homogêneas entre os grupos experimental e controle. A seguir, no período de 7 dias, houve um aumento dos valores médios da área radiolúcida para ambos os grupos, seguido de uma redução nos valores, de forma acentuada para o grupo controle, para os demais períodos. Os valores médios das áreas radiolúcidas e nível de significância

entre os grupos experimental e controle, de acordo com os períodos de observação são demonstrados na tabela 5.1 e no gráfico 5.1.

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimental e controle no período de 1 dia ($p = 0,251$). Após 7 dias houve um aumento da área radiolúcida para ambos os grupos, porém não houve diferença estatisticamente significativa entre eles ($p = 0,465$). Nos períodos subsequentes, tanto para o grupo experimental quanto para o grupo controle, houve diminuição gradativa da área radiolúcida do defeito ósseo, sendo maior para o grupo controle, com diferença estatisticamente significativa aos 14 dias ($p = 0,016$), 30 dias ($p = 0,009$), e 90 dias ($p = 0,028$).

Tabela 5.1 – Valores médios das áreas radiolúcidas observadas no interior dos defeitos ósseos e a significância entre os grupos experimental e controle de acordo com o período de observação. Valores em mm^2

<i>Período de Observação</i>	<i>Grupo</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio- padrão</i>	<i>Significância (p)</i>
1 dia	Experimental	4,66	1,05	0,251
	Controle	4,88	0,50	
7 dias	Experimental	4,81	0,38	0,465
	Controle	5,30	0,84	
14 dias	Experimental	4,41	0,54	0,016
	Controle	3,20	0,68	
30 dias	Experimental	3,95	0,43	0,009
	Controle	2,57	0,40	
90 dias	Experimental	3,56	0,96	0,028
	Controle	2,31	0,35

Gráfico 5.1 – Gráfico demonstrativo dos valores médios, em milímetros², das áreas do defeito ósseo para os grupos controle e experimental de acordo com os períodos de sacrifício

5.3 Avaliação histológica descritiva

Grupo Experimental

Período de 1 dia. Foram observadas nos cortes histológicos, predominantemente, margens do defeito ósseo ora viáveis ora desvitalizadas e exsudato neutrofílico e serofibrinoso no interior e ao redor do defeito. Processo inflamatório agudo entre as fibras musculares, promovendo dissociação das mesmas, foi verificado (Figura 5.6 – A,B).

Período de 7 dias. Observaram-se, nos cortes histológicos, margens do defeito desvitalizadas com discretos sinais de reabsorção, tecido de granulação preenchendo todo o defeito e infiltrado mononuclear junto ao defeito e entre as fibras

musculares. Áreas de osso neoformado a partir das corticais externas junto ao defeito ósseo, apresentando uma quantidade semelhante à largura mandibular e com atividade osteoblástica, também foram observadas. Não foi encontrada cartilagem (Figura 5.6 – C,D).

Figura 5.6 – Cortes histológicos representativos do grupo experimental nos períodos de 1 e 7 dias, (HE). **A - 1 dia** - Intenso exsudato neutrofilico no interior e ao redor do defeito, dissociando fibras musculares (Φ) (40X); **B - 1 dia** - Exsudato neutrofilico e serofibrinoso no interior do defeito (Φ) (100X); **C - 7 dias** - Grande quantidade de tecido de granulação no interior do defeito (*) e infiltrado inflamatório mononuclear ao redor do defeito (40X); **D - 7 dias** - Osso neoformado a partir das corticais externas (↕) (100X)

Período de 14 dias. Foram observadas nos cortes histológicos, predominantemente, margens do defeito desvitalizadas e em processo de reabsorção. Também foi verificada grande quantidade de osso neoformado a partir das corticais externas, apresentando uma quantidade acima do dobro da largura mandibular, com atividade osteoblástica e tendência ao fechamento completo do defeito. Também foi observado discreto infiltrado mononuclear entre as fibras musculares próximas ao defeito. Não foi observada cartilagem (Figura 5.7 – A,B).

Período de 30 dias. Observou-se nos cortes histológicos, predominantemente, osso neoformado em processo de maturação preenchendo parcial ou totalmente o defeito ósseo, com menor volume dos espaços medulares e maior quantidade de matriz óssea (calo ósseo exuberante). Foram encontrados sinais bastante discretos de cartilagem em meio ao osso em processo de maturação (Figura 5.7 – C).

Período de 90 dias. Foi observado nos cortes histológicos, predominantemente, defeito preenchido parcialmente por osso, sendo totalmente preenchido por osso apenas em um espécime, apresentando poucos espaços medulares, exibindo lamelas com sentido diferente do observado nos cotos e com volume que se estendia para além da largura mandibular (Figura 5.7 – D).

Figura 5.7 - Cortes histológicos representativos do grupo experimental nos períodos de 14, 30 e 90 dias, (HE). **A – 14 dias** – Grande quantidade de osso neoformado (Φ) (40X); **B – 14 dias** – Intensa atividade osteoblástica em meio ao osso neoformado (#) (100X); **C – 30 dias** – Osso neoformado em processo de maturação preenchendo o defeito ósseo (*) (40X); **D – 90 dias** – Osso maduro preenchendo o defeito ósseo (↓) (40X)

Grupo Controle

Período de 1 dia. Foram observadas nos cortes histológicos, predominantemente, margens do defeito ósseo desvitalizadas, exsudato neutrofílico e serofibrinoso no interior e ao redor do defeito. Processo inflamatório agudo entre as fibras musculares promovendo dissociação das mesmas foi observado (Figura 5.8 – A,B).

Período de 7 dias. Observaram-se nos cortes histológicos, predominantemente, margens do defeito ósseo desvitalizadas com sinais de reabsorção, tecido de granulação no interior do defeito e infiltrado mononuclear junto ao defeito e entre as fibras musculares. Também foi verificado osso neoformado a partir das corticais

externas junto ao defeito ósseo, com volume mais largo que a largura mandibular, assim como intensa atividade osteoblástica e discreta formação de cartilagem em meio ao osso neoformado (Figura 5.8 – C,D).

Figura 5.8 - Cortes histológicos representativos do grupo experimental nos períodos de 1 e 7 dias, (HE). **A - 1 dia** – Processo inflamatório agudo entre as fibras musculares promovendo dissociação das mesmas (Φ) (40X); **B - 1 dia** - Intenso exsudato neutrofílico e serofibrinoso no interior do defeito (↑) (100X); **C – 7 dias** - Tecido de granulação no interior do defeito ósseo (→) (40X); **D – 7 dias** - Osso neoformado a partir das corticais externas (#) (100X)

Período de 14 dias. Foram observadas nos cortes histológicos, predominantemente, margens do defeito desvitalizadas e em processo de reabsorção, assim como discreto tecido de granulação preenchendo o remanescente do defeito. Visualizou-se grande quantidade de osso neoformado com tendência ao fechamento do defeito e intensa atividade osteoblástica, bem como fibras musculares bem arranjadas com infiltrado mononuclear em seu permeio, (Figura 5.9 – A,B). Quantidade moderada de cartilagem na periferia do osso

neoformado junto ao defeito também foi observada. Em um espécime foi encontrada quantidade exuberante de cartilagem (Figura 5.10), aliada a presença de um sequestro ósseo, porém não foi observado processo infeccioso.

Período de 30 dias. Observou-se nos cortes histológicos, predominantemente, quantidade exuberante de osso neoformado em processo de maturação preenchendo parcial ou totalmente o defeito ósseo e pequena quantidade de cartilagem em meio ao osso neoformado dentro do defeito (Figura 5.9 – C).

Período de 90 dias. Foi observado nos cortes histológicos, predominantemente, defeito preenchido parcial ou totalmente por osso modelado, apresentando poucos espaços medulares, mudança no sentido das lamelas, e volume que se estendia discretamente além da largura mandibular (Figura 5.9 – D).

Figura 5.9 - Cortes histológicos representativos do grupo controle nos períodos de 14, 30 e 90 dias, (HE). **A – 14 dias** – Grande quantidade de osso neoformado a partir das corticais externas das margens do defeito (*) (40X); **B – 14 dias** – Margem do defeito desvitalizada (#) e em processo de reabsorção (100X); **C – 30 dias** – Osso neoformado em processo de maturação preenchendo o defeito ósseo (↑) (40X); **D – 90 dias** – Osso maduro com poucos espaços medulares preenchendo o defeito ósseo (#) - Remanescente do coto ósseo (*) (100X)

Figura 5.10 – Cortes histológicos de um espécime do grupo controle no período de 14 dias - **A** – coloração HE; **B** – coloração azul de toluidina. Intensa formação de cartilagem no interior e ao redor do defeito ósseo (↑); osso neoformado a partir das corticais externas (*); margem do defeito ósseo desvitalizada (→); sequestro ósseo no interior do defeito (#). (40X)

5.4 Avaliação histomorfométrica

Os valores médios das áreas de osso neoformado e a significância entre os grupos experimental e controle, de acordo com os períodos de observação, são demonstrados na tabela 5.2. A avaliação histomorfométrica, nos períodos de 7, 14 e 30 dias, revelou valores crescentes de áreas de osso neoformado, tanto para o grupo experimental quanto para o grupo controle, no decorrer destes períodos. Porém, o grupo controle apresentou maior quantidade de osso neoformado em todos os períodos de observação (Gráfico 5.2). Houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimental e controle para os períodos de 7 dias ($p = 0,049$) e 14 dias ($p = 0,049$).

Tabela 5.2 – Valores médios das áreas de osso neoformado observadas no interior e ao redor do defeito ósseo, e a significância entre os grupos experimental e controle de acordo com os períodos de observação de 7, 14 e 30 dias. Valores em mm^2

Período de Observação	Grupo	Média	Desvio-padrão	Significância (p)
7 dias	experimental	3,91	0,10	0,049
	controle	5,84	0,74	
14 dias	experimental	6,04	0,59	0,049
	controle	7,72	0,86	
30 dias	experimental	6,82	0,83	0,184
	controle	7,80	0,16

Gráfico 5.2 – Gráfico demonstrativo dos valores médios, em milímetros², das áreas de osso neoformado observadas por todo o corte histológico de acordo com os períodos de observação

5.5 Análises bioquímicas

Não houve perda de nenhuma amostra de sangue colhida, tendo sido dosados dois marcadores de formação óssea, fosfatase alcalina e cálcio séricos, para todos os períodos de sacrifício. Os valores do controle negativo e os de referência são observados no Anexo A.

5.5.1 Fosfatase alcalina sérica

Os valores médios dos níveis séricos de fosfatase alcalina e a significância entre os grupos experimental e controle, de acordo com os períodos de observação, são

demonstrados na tabela 5.3. A análise bioquímica dos níveis séricos de fosfatase alcalina mostrou valores médios maiores para o grupo controle quando comparado ao grupo experimental. No grupo controle, nos períodos de 1, 7 e 14 dias, foram observados valores médios altos, seguidos de uma redução gradativa, nos períodos subsequentes. Para o grupo experimental, somente no período de 1 dia que foi observado um valor médio maior que os demais períodos de observação, sendo que estes se apresentavam bastante similares (Gráfico 5.3). Houve diferença estatisticamente significativa dos valores médios de fosfatase alcalina entre os grupos experimental e controle para os períodos de 1 dia ($p = 0,049$), 7 dias ($p = 0,049$) e 14 dias ($p = 0,049$).

Tabela 5.3 – Valores médios dos níveis séricos de fosfatase alcalina e a significância entre os grupos experimental e controle de acordo com os períodos de observação. Valores em U/L

<i>Período de Observação</i>	<i>Grupo</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio-padrão</i>	<i>Significância (p)</i>
1 dia	Experimental	48,27	10,55	0,049
	Controle	81,33	14,28	
7 dias	Experimental	23,87	1,00	0,049
	Controle	90,03	13,15	
14 dias	Experimental	29,47	8,98	0,049
	Controle	63,90	16,20	
30 dias	Experimental	23,47	4,35	0,127
	Controle	34,33	8,00	
90 dias	Experimental	22,77	3,78	0,275
	Controle	19,13	2,40

Gráfico 5.3 – Gráfico demonstrativo dos valores médios de fosfatase alcalina (medidos em U/L) segundo os grupos e períodos de observação

5.5.2. Cálcio sérico

Os valores médios dos níveis de cálcio sérico e a significância entre os grupos experimental e controle, de acordo com os períodos de observação, são apresentados na tabela 5.4. A análise bioquímica dos níveis de cálcio sérico mostrou valores médios bastante semelhantes entre os grupos experimental e controle nos diversos períodos do estudo, com exceção do período de 1 dia, onde foi observado maior valor para o grupo controle (Gráfico 5.4). Houve diferença estatisticamente significativa para os valores médios de cálcio sérico entre os grupos experimental e controle somente no período de 1 dia ($p = 0,049$).

Tabela 5.4 - Valores médios dos níveis de cálcio sérico e a significância entre os grupos experimental e controle, de acordo com os períodos de observação. Valores em mg/dl

<i>Período de Observação</i>	<i>Grupo</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio-padrão</i>	<i>Significância (p)</i>
1 dia	Experimental	5,10	1,37	0,049
	Controle	8,23	1,39	
7 dias	Experimental	6,43	0,12	0,500
	Controle	6,60	1,21	
14 dias	Experimental	8,13	0,85	0,127
	Controle	6,30	1,37	
30 dias	Experimental	7,63	1,17	0,513
	Controle	6,97	1,30	
90 dias	Experimental	8,57	0,35	0,184
	Controle	7,90	0,70

Gráfico 5.4 – Gráfico demonstrativo dos valores médios de cálcio sérico (medidos em mg/dl) segundo os grupos e períodos de observação

6 DISCUSSÃO

No presente estudo, em que foram avaliados os efeitos da amlodipina sobre o processo de reparo de um defeito ósseo simulando fratura mandibular em ratos, foi possível evidenciar que a cronologia do processo de reparo evoluiu sem atrasos, porém com um menor volume de osso neoformado no interior e ao redor do defeito ósseo. As análises radiográficas, histomorfométrica e a avaliação dos níveis de fosfatase alcalina mostraram influências negativas da amlodipina no processo de reparo ósseo.

Os medicamentos bloqueadores de canais de cálcio são efetivos agentes antihipertensivos (GHORAYEB; ARMAGANIJAN; SAVIOLI NETO, 1994; NADAR; BLANN; LIP, 2004; VALCÁRCEL et al., 2006; ZANETTI-ELSHATER et al., 1994). Sua potencia antihipertensiva é comparável aos beta-bloqueadores e aos inibidores da enzima conversora de angiotensina (CLEMENTE; DE BUYZERE; DUPREZ, 1994). Estes antagonistas de cálcio têm mostrado efeitos positivos não somente na redução da pressão sanguínea sistólica e diastólica, como também na redução da morbidade cardiovascular e mortalidade (GHORAYEB; ARMAGANIJAN; SAVIOLI NETO, 1994; VALCÁRCEL et al., 2006). A amlodipina tem sido considerada uma das principais drogas utilizadas no tratamento da hipertensão arterial (GHORAYEB; ARMAGANIJAN; SAVIOLI NETO, 1994; YAMAZAKI et al., 1998), constituindo também uma excelente opção para o uso combinado a outros medicamentos antihipertensivos com resultados expressivos (CHOI et al., 2009; CHRYSANT; BAKRIS, 2004; KOHLMANN et al., 2006; MESSERLI; WEIR; NEUTEL, 2002; VALCÁRCEL et al., 2006). A amlodipina apresenta um perfil farmacocinético

exclusivo comparado aos demais bloqueadores dos canais de cálcio, que é caracterizado pela absorção quase completa, concentrações plasmáticas com pico tardio, alta biodisponibilidade e lenta biodegradação hepática. Esse perfil se traduz em benefícios clínicos potenciais, por força de um início de ação lento e efeito de longa duração (VAN ZWIETEN, 1994). A principal reação adversa causada pelo uso crônico da amlodipina é o edema dos membros inferiores, que se desenvolve como resultado de um desequilíbrio das forças hidrostáticas nos capilares periféricos e consequente extravasamento de líquidos para o espaço intersticial (KOHLMANN et al., 2006; ZANETTI-ELSHATER et al., 1994). Os medicamentos bloqueadores dos canais de cálcio, por interferir no transporte de cálcio através das membranas celulares, também podem afetar muitos processos metabólicos, incluindo o metabolismo ósseo (DURIEZ et al., 1993; TEÓFILO; BRENTGANI; LAMANO CARVALHO, 2001).

Quanto a dosagem de amlodipina empregada neste estudo, os animais receberam doses diárias de 0,04 mg / rato / dia, durante todo o estudo, sendo esta uma dose compatível com a prescrição em humanos, que é de 5 a 10 mg por dia, a menor dose sugerida para pacientes idosos e com insuficiência hepática (TEÓFILO; BRENTGANI; LAMANO CARVALHO, 2001). As doses terapêuticas de Amlodipina utilizadas em ratos, publicadas na literatura, variam de 0,02 mg / 100 mg (KANNO et al., 1996) a 3 mg / 100 mg de peso corporal (TAKAHASHI et al., 1996).

A metodologia empregada neste estudo, com a realização de uma osteotomia na mandíbula de ratos simulando fratura óssea, mostrou ser um método de simples realização e bastante eficaz nas avaliações radiográficas e histológicas propostas. O defeito ósseo mostrou-se bem homogêneo inicialmente, seguido por um processo normal de reparo de fratura, por meio de reabsorção e neoformação

óssea, e a fratura, por todos os períodos do estudo, permaneceu estável, pois não foi realizado um seccionamento total da mandíbula. O processo de reparo ósseo pode ser estudado por diversos modelos experimentais (AGUIAR, 2008; CARVALHO; BOMBONATO; BRENTGANI, 1997; FLACH et al., 2008; GRANSTROM; NILSSON, 1987). Porém, este modelo tem sido empregado com bastante sucesso em nosso departamento, em pesquisas que avaliaram o processo de reparo ou de crescimento ósseo (AGUIAR, 2008; RABEQUE et al., 2002; RODRIGUES; MIYAZAKI; LUZ, 2004). O rato é um animal de pequeno porte, de fácil manuseio e custo acessível, podendo ser usado em quantidades numerosas, e as lesões ósseas confeccionadas por meio de brocas proporcionam formas homogêneas. Deste modo, avaliações radiográficas e histológicas do processo natural de reparo ósseo são realizadas de forma segura e confiável. Os animais não são afetados nas funções de deambulação e alimentação, pois este defeito ósseo simula uma fratura estável e que não afeta os dentes (AGUIAR, 2008; RABEQUE et al., 2002; RODRIGUES; MIYAZAKI; LUZ, 2004).

Radiograficamente foi possível verificar homogeneidade da área do defeito ósseo no período de um dia, seguida de áreas de radiolucidez aumentada nas margens do defeito, correspondendo à reabsorção óssea pela atividade osteoclástica, no período de 7 dias. Porém, o grupo tratado com amlodipina apresentou menores índices de reabsorção neste período de 7 dias. Nos demais períodos, houve diferenças significativas no processo de preenchimento do defeito por área radiopaca entre os grupos experimental e controle, havendo um fechamento da área do defeito sempre em menor proporção para o grupo experimental. Em ambos os grupos, no período final do experimento, foi observado a permanência de uma área radiolúcida no terço inferior do defeito ósseo. Estes dados

concordam com os resultados encontrados por Rabeque et al. (2002), que observaram preenchimento do defeito mandibular por tecido ósseo remodelado, com exceção da borda inferior, onde havia tecido fibroso e adiposo. Estudos já demonstraram que no processo de reparo de fraturas ósseas ocorre uma reabsorção inicial das margens ósseas, representada por aumento na radiolucidez, seguida do processo de neoformação e mineralização óssea, com aumento gradual da radiopacidade no interior do defeito durante todo o processo de reparo (GRANSTROM; NILSSON, 1987; RABEQUE et al., 2002). A menor taxa de reabsorção óssea no período de 7 dias para o grupo experimental pode ser explicada por estudos que observaram efeitos diretos na função dos osteoclastos por drogas bloqueadoras dos canais de cálcio (RITCHIE; MAERCKLEIN; FITZPATRICK, 1994). Segundo estes autores, os bloqueadores dos canais de cálcio foram capazes de inibir a função dos osteoclastos, porém não afetaram o crescimento e diferenciação dos osteoblastos. A menor taxa de formação óssea, observada radiograficamente para os períodos de 14 a 90 dias do grupo experimental, concorda com os estudos de Duriez et al. (1990), que observaram radiograficamente menor formação óssea em região heterotópica em ratos tratados com o bloqueador de canais de cálcio verapamil, assim como alterações no crescimento e remodelação óssea em coelhos jovens que usavam nifedipina (DURIEZ et al., 1993). Por outro lado, alguns estudos observaram que os bloqueadores de canais de cálcio, principalmente a benidipina, podem favorecer a formação óssea, promovendo intensa diferenciação dos osteoblastos (NISHIYA et al., 2002) e aumento na mineralização *in vitro* (NISHIYA; SUGIMOTO, 2001). Nossos dados discordam destes estudos de Nishiya e Sugimoto (2001) e Nishiya et al. (2002), pois segundo os próprios autores a benidipina apresenta maior afinidade

pelos canais de cálcio dos osteoblastos, assim como maior capacidade em estimular a atividade de fosfatase alcalina, quando comparada a amlodipina.

A avaliação histológica descritiva mostrou evolução semelhante na cronologia do processo de reparo ósseo para os grupos experimental e controle. Imediatamente após a fratura mandibular, tanto para o grupo experimental quanto para o grupo controle, ocorreu a formação de um processo inflamatório agudo, com infiltrado neutrofílico e serofibrinoso no interior do defeito e entre as fibras musculares adjacentes. A seguir, houve início do processo de reabsorção e neoformação óssea, a partir das margens do defeito e corticais externas da mandíbula, associada à presença de tecido de granulação no interior do defeito. Os períodos subsequentes seguiram com neoformação e remodelação óssea e tendência ao fechamento completo do defeito em alguns animais de ambos os grupos estudados (AGUIAR, 2008; FLACH et al., 2008; RABEQUE et al., 2002). Estes dados concordam com estudos que relataram o processo normal de reparação de fraturas ósseas (DOUGLAS, 2006; FLACH et al., 2008). Na análise histomorfométrica, o grupo tratado com amlodipina apresentou volume significativamente menor de osso neoformado quando comparado ao grupo controle para os períodos iniciais de 7 e 14 dias. Estes períodos correspondem à fase de maior atividade osteoblástica e formação óssea. Concordando, Granstrom e Nilsson (1987), autores que desenvolveram um modelo de fratura mandibular em ratos, semelhante ao utilizado neste estudo, observaram que nos períodos iniciais do reparo ósseo ocorre exuberante formação de osso trabecular a partir do periósteo, com estabilidade da fratura obtida após duas semanas. Interferências negativas no processo de reparo e formação óssea em animais com uso crônico de drogas bloqueadoras dos canais de cálcio têm sido demonstradas (DURIEZ et al., 1990,

1993; TEÓFILO; BRENTGANI; LAMANO CARVALHO, 2001). Menor quantidade de ossificação, porém sem alteração na proporção de tecido osteóide e osso lamelar já foi observada em ratos tratados com o bloqueador dos canais de cálcio verapamil (DURIEZ et al., 1990). Um estudo que avaliou o processo de reparo ósseo alveolar de ratos sob o uso crônico de amlodipina, em dose idêntica a utilizadas no presente estudo, encontrou uma diminuição de 20% a 30% do volume de osso neoformado (TEÓFILO; BRENTGANI; LAMANO CARVALHO, 2001). Por outro lado, quando se avaliou o processo de reparo de alvéolos dentários de ratos tratados com Isradipina, um bloqueador dos canais de cálcio de primeira geração, não foram encontradas alterações na cronologia e qualidade do processo de reparo ósseo (AMORIN, 1995). Na análise histomorfométrica, no período de 30 dias, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa no volume de osso neoformado entre os grupos da amlodipina e controle. Este dado, discorda do observado por Duriez et al. (1990, 1993), em que foi observado, após lesão promovida cirurgicamente, um menor volume de osso neoformado durante todos os períodos analisados para os animais tratados com as drogas bloqueadoras de canais de cálcio amlodipina e nifedipina, respectivamente.

Na análise bioquímica foram avaliados dois marcadores para a remodelação óssea: a fosfatase alcalina e o cálcio sérico. A atividade de fosfatase alcalina encontrada no presente estudo foi significante menor para o grupo experimental comparado ao grupo controle, para os períodos iniciais de 1, 7 e 14 dias. Na avaliação entre todos os períodos do grupo controle, foram observados valores significativamente maiores para os períodos iniciais comparado aos períodos de 30 e 90 dias. Quando estes dados foram comparados aos valores do controle negativo (Anexo A) e aos valores de referência de Mitruka e Rawnsley (1977), observou-se

maior atividade de fosfatase alcalina somente para o grupo controle nos períodos de 1, 7 e 14 dias. Este fato aumenta a confiabilidade e a importância clínica dos valores encontrados no estudo, pois confirma o aumento da atividade osteoblástica (FINI et al., 2004). Estes valores normais em modelos experimentais podem variar de acordo com o meio ambiente, com a linhagem, idade do animal, condições do biotério e procedimentos realizados. Embora a atividade de fosfatase alcalina no osso não seja completamente conhecida, estudos prévios têm mostrado que esta enzima indica a atividade de osteoblastos sendo essencial na formação óssea normal, e sua mensuração quantitativa, assim como o aumento de seus níveis, teria importância fundamental na recuperação de uma fratura (FINI et al., 2004; LEITE, 2005). Desta forma, pode-se afirmar que os animais tratados com amlodipina apresentaram quantidade significativamente menor de células da linhagem osteogênica no calo ósseo, interferindo na quantidade de osso neoformado. Também foi possível afirmar que o grupo controle apresentou intensa neoformação óssea nos períodos iniciais comparado aos períodos de 30 e 90 dias.

A dosagem de cálcio sérico foi realizada com o intuito de observar o comportamento deste íon durante as diferentes fases do processo de consolidação avaliadas nesta pesquisa. O aumento da atividade de fosfatase alcalina no processo de reparo de uma fratura óssea deveria favorecer a deposição de cálcio no tecido ósseo e conseqüentemente diminuir sua concentração no plasma sanguíneo (LEITE, 2005), porém não foi observada diferenças significativas nas concentrações de cálcio sérico entre os grupos experimental e controle. Estes valores também estiveram de acordo com os valores de referência observados por Mitruka e Rawnsley (1977) e discretamente inferiores aos valores do controle negativo (Anexo A). Estes dados concordam com estudos que avaliaram a influência de outros

medicamentos no processo de reparo ósseo em ratos, como os bisfosfonatos e as estatinas (FERREIRA JÚNIOR et al., 2008) e a nifedipina (DURIEZ et al., 1993), em que os níveis do cálcio sérico permaneceram sem alterações significativas. O presente estudo parece ser o primeiro que avalia os níveis de fosfatase alcalina e cálcio sérico em ratos tratados com amlodipina que foram submetidos à fratura óssea.

Existem duas teorias principais de mecanismos fisiológicos por onde as drogas bloqueadoras de canais de cálcio poderiam interferir no metabolismo ósseo. O primeiro mecanismo proposto corresponde à ação destas drogas sobre os osteoblastos (GUGGINO et al., 1989; NISHIYA; SUGIMOTO, 2001; NISHIYA et al., 2002). A regulação da homeostasia do cálcio nos osteoblastos é complexa (HALICI et al., 2008). Canais de cálcio tipo-L foram mostrados em células de osteossarcomas em ratos (GUGGINO et al., 1989) e em ratos com uma linhagem de células semelhantes a osteoblastos (MORAIN; PEGLION; GIESEN-CROUSE, 1992). Reguladores de formação óssea modulam a expressão destes canais, sugerindo um envolvimento funcional dos canais de cálcio tipo-L no remodelamento ósseo (GU et al., 2001). Desta forma, a função dos osteoblastos e o metabolismo ósseo podem sofrer interferências se as atividades dos canais de cálcio estiverem alteradas pelo uso de drogas bloqueadores destes canais (HALICI et al., 2008). Estudos *in vitro* têm demonstrado que os antagonistas de canais de cálcio agem sobre os osteoblastos e inibem a reabsorção óssea, enquanto que drogas agonistas estimulam a reabsorção óssea (GUGGINO et al., 1989; NISHIYA; SUGIMOTO, 2001; NISHIYA et al., 2002). Efeitos mais significantes sobre a função dos osteoblastos têm sido descritos para o bloqueador de canais de cálcio benidipina, pois este promove um potente bloqueio do influxo de cálcio através dos canais de

cálcio tipo-L, e conseqüentemente, estimula a diferenciação osteoblástica e o aumento da atividade de fosfatase alcalina (NISHIYA; SUGIMOTO, 2001; NISHIYA et al., 2002). Contrariando estes estudos citados anteriormente, Ritchie, Maercklein e Fitzpatrick (1994) afirmaram que os bloqueadores dos canais de cálcio influenciam na redução da reabsorção óssea em conseqüência de efeitos diretos nas funções dos osteoclastos, e não sobre os osteoblastos. Segundo Nishiya et al. (2002), esta controvérsia ocorreu entre os estudos pois as culturas de células foram realizadas com células em diferentes graus de diferenciação, sendo que a benidipina não tem efeitos na atividade de fosfatase alcalina em células osteoblásticas maduras.

A segunda hipótese corresponde à interferência destas drogas na produção de hormônios esteróides. Almeida et al. (2000) encontraram que o uso crônico de amlodipina em ratos, tratados com a mesma dosagem que a utilizada em nosso estudo, promoveu significativa redução na produção dos hormônios estimulador de folículos e testosterona. Concordando, Pacotte, Ehrenstein e Fitzpatrick (1995) observaram que o uso de drogas com atividade antagonista dos canais de cálcio promoveu redução na produção do paratormônio, enquanto que drogas agonistas dos canais de cálcio aumentaram sua produção. É consenso na literatura que a redução na produção dos hormônios esteróides é o principal fator de risco para ocorrer perda óssea e desenvolvimento de osteoporose (ERBEN et al., 2000; ORWOLL, 1998; YAO et al., 2007). A deficiência de hormônios esteróides também apresenta influências negativas no processo de reparo ósseo, como demonstrado em alvéolos dentários de ratas submetidas à ovariectomia (PEREIRA MC et al., 2007). A deficiência de estrógeno pode alterar tanto o processo de remodelação quanto o de reparação óssea (AMADEI et al., 2006; IKEO; KAMADA; GODA, 2007). Em relação à reparação óssea, ainda não foi determinado qual estágio é mais

alterado pela deficiência estrogênica, se é a fase inicial, a fase de formação do calo ósseo, a fase de mineralização ou, ainda, a fase de remodelação óssea (AMADEI et al., 2006). De forma geral, sabe-se que na deficiência de hormônio do crescimento e de testosterona, ocorre uma redução na taxa de formação óssea periosteal (PRAKASAM et al., 1999). Concordando com as pesquisas acima relatadas, no presente estudo, a cronologia do processo de reparo ósseo parece ter sido semelhante entre os grupos experimental e controle, porém houve uma redução significativa no volume de osso neoformado a partir das corticais externas da mandíbula, sugerindo menor reatividade periosteal do grupo tratado com amlodipina. Desta forma, embora a maioria dos efeitos dos hormônios androgênicos sobre a formação óssea tenha sido avaliada em animais orquidectomizados, que apresentam redução na formação óssea periosteal e osteopenia (GUNNESS; ORWOLL, 1995; REIM et al., 2008), pode ser que a redução na produção de hormônio testosterona observada em ratos machos tratados com amlodipina (ALMEIDA et al., 2000), tenha influenciado nos resultados encontrados neste estudo, com menor formação de osso a partir das corticais externas. Analisando as duas hipóteses mencionadas acima, dos possíveis mecanismos de ação dos bloqueadores de canais de cálcio sobre o metabolismo ósseo, observa-se que a primeira, que se relaciona com os osteoblastos, apresentaria tendência a inibir a reabsorção óssea, enquanto a segunda, que se relaciona com os hormônios andrógenos, apresentaria tendência a estimular a reabsorção óssea e prejudicar a reparação de fraturas.

Os dados encontrados na literatura quanto à influência dos bloqueadores de canais de cálcio sobre o processo de reabsorção óssea são contraditórios. Existem estudos que sugerem que a amlodipina teria um efeito benéfico sobre o metabolismo

ósseo, principalmente por inibir a reabsorção óssea e promover maior deposição de cálcio em ratos com tendência a desenvolver osteoporose (HALICI et al., 2008). Resultados similares já foram vistos por Guggino et al. (1989), que mostraram que a reabsorção óssea em ratos sadios foi inibida pelo desmetoxiverapamil, um antagonista dos canais de cálcio, e estimulada pelo BAY K 8644, um agonista dos canais de cálcio. Segundo estes autores, drogas que bloqueiam estes canais de cálcio podem ter efeitos benéficos sobre a osteoporose ou outras disfunções ósseas relacionadas a aumento da reabsorção óssea. Por outro lado, existem dados na literatura demonstrando que os bloqueadores dos canais de cálcio, em doses terapêuticas provavelmente não afetam o metabolismo ósseo (BOESGAARD; HYLDSTRUP; FELDSTEDT, 1991). Dentre algumas drogas já estudadas (amlodipina, nifedipina, verapamil e galopamil) apenas a nifedipina poderia atuar inibindo a reabsorção óssea *in vivo* (REDILICH et al., 1997). Ainda existem relatos demonstrando efeitos opostos do bloqueador de cálcio verapamil entre ratos machos e fêmeas, em que foi encontrado osteopenia para as fêmeas e aumento na mineralização e melhor qualidade óssea para os machos (SAMNERGARD; SJODÉN, 1992).

Estudos clínicos têm avaliado a possibilidade da influência de drogas antihipertensivas no risco de fraturas ósseas. Uma moderada redução no risco de fraturas ósseas entre usuários de diuréticos tiazidas e beta-bloqueadores tem sido descritas (WIENS et al., 2006). Para os bloqueadores dos canais de cálcio, um estudo mostrou aumento no risco de fraturas de colo de fêmur (COUTINHO; SILVA, 2002). Por outro lado, um estudo com chineses acima dos 65 anos de idade, mostrou que os diuréticos tiazidas e os inibidores da enzima conversora de angiotensina apresentaram efeitos benéficos na osteoporose, e que as drogas

bloqueadoras dos canais de cálcio resultaram em aumento da densidade óssea para a espinha lombar em mulheres (LYNN et al., 2006).

O metabolismo ósseo também pode ser alterado diretamente pela própria hipertensão arterial (GOTOH et al., 2005; PÉREZ-CASTRILLÓN et al., 2003). Vários estudos têm sugerido que a hipertensão arterial sistêmica está associada com o risco de perda óssea e promoção da osteoporose tanto em humanos (GOTOH et al., 2005; TSUDA; NISHIO; MASUYAMA, 2001) quanto em animais (WANG et al., 1993). O mecanismo desta relação ainda não está claro, porém, é sugerido que ocorra devido às mudanças no metabolismo do cálcio presente nos hipertensos (GOTOH et al., 2005; PEREIRA AC et al., 2007; TZUDA; NISHIO; MASUYAMA, 2001). A hipercalciúria é uma das alterações mais freqüentes nos hipertensos, e esta é inversamente proporcional à densidade de massa óssea (PÉREZ-CASTRILLÓN et al., 2003). Análises de densitometria óssea têm demonstrado uma redução significativa na densidade mineral óssea em mulheres hipertensas comparadas a não hipertensas (TZUDA; NISHIO; MASUYAMA, 2001). Porém existem estudos em que não foi encontrada relação da massa óssea com a pressão arterial sistólica e diastólica (PÉREZ-CASTRILLÓN et al., 2003). O mecanismo de redução da massa óssea em hipertensos também pode estar relacionado a uma taxa de reabsorção maior que a de formação óssea, com a atividade osteoclástica sendo dominante sobre a atividade osteoblástica (WANG et al., 1993). O aumento no número de osteoclastos associado a uma redução no número de osteoblastos e células osteoprogenitoras pode justificar a acentuada reabsorção dos ossos cortical e trabecular encontrada em animais hipertensos (PEREIRA AC et al., 2007; WANG et al., 1993). No presente estudo, como não havia interesse na avaliação da pressão arterial sistêmica e sim a influência da amlodipina no metabolismo ósseo, optou-se

por ratos normotensos com intuito de reduzir o risco de possíveis alterações nos resultados por influência da hipertensão arterial (MOREL; GODFRAIND, 1994). Estudos com ratos normotensos, que fizeram uso do antihipertensivo amlodipina, não apresentaram alterações em seus níveis pressóricos (MOREL; GODFRAIND, 1994), demonstrando que os resultados obtidos neste estudo, não foram influenciados por este mecanismo. Porém, novos estudos devem ser feitos considerando estas características.

7 CONCLUSÕES

Neste estudo dos efeitos do uso crônico da amlodipina na reparação óssea de um defeito cirúrgico simulando fratura no ramo mandibular de ratos e nos níveis séricos de fosfatase alcalina e cálcio, foi possível concluir que:

- A análise histológica mostrou evolução semelhante na cronologia do processo de reparo do defeito ósseo entre os grupos experimental e controle. Porém, na análise histomorfométrica observou-se um volume de osso neoformado significativamente reduzido para o grupo experimental;
- Houve menos reabsorção óssea, nos períodos iniciais, para o grupo experimental. Porém, nos períodos subsequentes, as áreas radiolúcidas observadas foram menores para o grupo controle;
- Os níveis séricos de fosfatase alcalina foram significativamente maiores no grupo controle, para os períodos iniciais, quando comparado ao grupo experimental;
- Não houve diferenças significativas nos níveis de cálcio sérico entre os grupos;
- De forma geral, o uso crônico da amlodipina permitiu a reparação do defeito ósseo mandibular experimental, porém com menor volume de osso neoformado, nas fases proliferativas do processo, associado a menores níveis séricos de fosfatase alcalina.

REFERÊNCIAS¹

Aguiar LT. Avaliação do efeito do metotrexato na reparação tecidual em um defeito ósseo simulando fratura de mandíbula em ratos [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Medicina da USP; 2008.

Almeida AS, Teófilo JM, Franci JAA, Brentegani LG, Lamano Carcalho TL. Antireproductive effect of the calcium channel blocker amlodipine in male rats. *Exp Toxicol Pathol* 2000;52:352-6.

Amadei SU, Silveira VAS, Pereira AC, Carvalho YR, Rocha RF. A influência da deficiência estrogênica no processo de remodelação e reparação óssea. *J Bras Patol Méd Lab* 2006;42(1):5-12.

Amorin JBO. Efeitos da isradipina (LomirR), agente inibidor de canais de cálcio, no processo de reparo em feridas de extração dental: estudo histológico em ratos [Dissertação de Mestrado]. São José dos Campos: Universidade Estadual Paulista; 1995.

Boesgaard S, Hyldstrup L, Feldstedt M. Changes in calcium homoeostasis and bone formation in patients recovering from acute myocardial infarction: effect of verapamil treatment. Danish study group on verapamil in myocardial infarction. *Eur J Clin Pharmacol* 1991;41(6):521-3.

Carvalho TLL, Bombonato KF, Brentegani LG. Histometric analysis of rat alveolar wound healing. *Braz Dent J* 1997;8(1):9-12.

Choi SM, Seo MJ, Kang KK, Kim JH, Ahn BO, Yoo M. Beneficial effects of the combination of amlodipine and losartan for lowering blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Arch Pharm Res* 2009;32(3):353-8.

Chrysant SG, Bakris GL. Amlodipine / benazepril combination therapy for hypertensive patients nonresponsive to benazepril monotherapy. *Am J Hypertens* 2004;17(7):590-6.

¹ De acordo com Estilo Vancouver – Abreviatura de periódicos segundo base de dados MEDLINE.

Clement DL, De Buyzere M, Duprez D. Antihypertensive effects of calcium antagonists. Clinical facts and modulating factors. *Am J Hypertens* 1994;7(7Pt2):16S-22S.

Coutinho ESF, Silva SD. Uso de medicamentos como fator de risco para fratura grave decorrente de queda em idosos. *Cad Saúde Pública* 2002;18(5):1359-66.

Douglas C. Consolidação óssea. In: Manganello-Souza LC, Luz JGC. *Tratamento Cirúrgico do Trauma Bucomaxilofacial*. 3. ed. São Paulo: Roca; 2006. p. 57-67.

Duriez J, Flautre B, Blary MC, Duriez R. Effect of a calcium inhibitor, verapamil, on the development of heterotopic ossifications. An experimental study in rats. *Int Orthop* 1990;14(4):415-21.

Duriez J, Flautre B, Blary MC, Hardouin P. Effects of the calcium channel blocker nifedipine on epiphyseal growth plate and bone turnover: a study in rabbit. *Calcif Tissue Int* 1993;52(2):120-4.

Erben RG, Eberle J, Stahr K, Goldberg M. Androgen deficiency induces high turnover osteopenia in aged male rats: a sequential histomorphometric study. *J Bone Miner Res* 2000;15(6):1085-98.

Ferreira Júnior DB, Pinto AS, Del Carlo RJ, Fonseca CC, Oliveira TT, Cardoso CA, et al. Efeitos de bifosfonatos e estatinas na reparação de fraturas em tíbias de ratas com osteoporose induzida com dexametasona. *Rev Ciênc Farm Básica Apl* 2008;29(2):203-9.

Fini M, Giavaresi G, Torricelli P, Borsari V, Giardino R, Nicolini A, et al. Osteoporosis and biomaterial osteointegration. *Biomed Pharmacother* 2004;58:487-93.

Flach DM, Gorgozinho KB, Prazeres MN, Junior OS, Souza VG. Regeneração Óssea em Cães e Gatos. UFF. Faculdade de Veterinária. Disciplina de Patologia e Clínica Cirúrgica Veterinária. Disponível em:
[URL:http://www.geocities.com/CollegePark/Classroom/6137/textrege.html](http://www.geocities.com/CollegePark/Classroom/6137/textrege.html) [2008 mar. 25].

Ghorayeb N, Armaganijan D, Savioli Neto F. Efeitos da amlodipina na hipertensão arterial leve e moderada do idoso: avaliação a longo prazo. *RBM Rev Bras Med* 1994;51(8):1061-4.

Gotoh M, Mizuno K, Ono Y, Takahashi M. High blood pressure, bone-mineral loss and insulin resistance in women. *Hypertens Res* 2005;28(7):565-70.

Granstrom G, Nilsson LP. Experimental mandibular fracture: studies on bone repair and remodellation. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg* 1987; 21(2): 159-65.

Gu Y, Preston MR, Magnay J, El Haj AJ, Publicover SJ. Hormonally-Regulated Expression of Voltage-Operated Ca^{2+} Channels in Osteocytic (MLO-Y4) Cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;282(2):536-42.

Guggino SE, Lajeunesse D, Wagner JA, Snyder SH. Bone remodeling signaled by a dihydropyridine- and phenylalkylamine-sensitive calcium channel. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86(8):2957-60.

Gunness M, Orwoll E. Early induction of alterations in cancellous and cortical bone histology after orchietomy in mature rats. *J Bone Miner Res* 1995;10(11):1735-44.

Halici Z, Borekci B, Ozdemir Y, Cadirci E, Suleyman H. Protective effects of amlodipine and lacidipine on ovariectomy-induced bone loss in rats. *Eur J Pharmacol* 2008;579:241-5.

Ikeo T, Kamada A, Goda S. Osteoporosis and oral biology. *Clin Calcium* 2007;17(2):150-6.

Kanno Y, Okada H, Suzuki H, Ikenaga H, Ishii N, Itoh H, et al. Does combined therapy of ca-channel blocker and angiotensina converting enzyme inhibitor exceed monotherapy in renal protection against hypertensive injuri in rats? *Clin Exper Hypertension* 1996;18(2):243-56.

Kohlmann O, Oigman W, Mion D, Rocha JC, Gomes MAM, Salgado N, et al. Estudo "LOTHAR": avaliação de eficácia e tolerabilidade da combinação fixa de anlodipino e losartana no tratamento da hipertensão arterial primária. *Arq Bras Cardiologia* 2006;86(1):39-51.

Leite VL. Estudo comparativo de efeito do ultra-som de 1 MHz de frequência de repetição de pulso a 100 Hz e 16 Hz no tratamento de fratura de fíbula de rato [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Escola de Engenharia de São Carlos/ Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/ Instituto de Química de São Carlos; 2005.

Lynn H, Kwok T, Wong SYS, Woo J, Leung PC. Angiotensin converting enzyme inhibitor use is associated with higher bone mineral density in elderly Chinese. *Bone* 2006;38(4):584-8.

Messerli FH, Weir MR, Neutel JM. Combination therapy of amlodipina/benazepril versus monotherapy of amlodipina in a practice-based setting. *Am J Hypertens* 2002;15(6):550-6.

Mitruka BM, Rawnsley HM. Clinical Biochemical and hematológica reference values in normal experimental animals. New York: Masson Publishing; 1977.

Morain P, Peglion JL, Giesen-Crouse E. Ca^{2+} channel inhibition in a rat osteoblast-like cell line, UMR 106, by a new dihydropyridine derivative, S11568. *Eur J Pharmacol* 1992;220:11-7.

Morel N, Godfraind T. Selective interaction of the calcium antagonist amlodipine with calcium channels in arteries of spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 1994;24(4):524-33.

Nadar S, Blann AD, Lip GY. Platelet morphology and plasma indices of platelet activation in essential hypertension: effects of amlodipina-based antihypertensive therapy. *Ann Med* 2004;36(7):552-7.

Nishiya Y, Kosaka N, Uchii M, Sugimoto S. A potent 1,4-dihydropyridine L-type calcium channel blocker, benidipina, promotes osteoblast differentiation. *Calcif Tissue Int* 2002;70:30-9.

Nishiya Y, Sugimoto S. Effects of various antihypertensive drugs on the function of osteoblast. *Biol Pharm Bull* 2001;24(6):628-33.

Orwoll ES. Osteoporosis in men. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1998;27:349-67.

Pacotte SL, Ehrenstein G, Fitzpatrick LA. Role of calcium channels in parathyroid hormone secretion. *Bone* 1995;16(suppl 4):365S-72S.

Pereira AC, Amadei SU, Silveira VÁS, Balducci I, Faig-Leite H. Comparative study of cortical, trabecular and marrow áreas percentage in hypertensive (SRH) and normotensive rats femur. *Cienc Odontol Bras* 2007;10(1):64-9.

Pereira MC, Zecchin KG, Campagnoli EB, Jorge J. Ovariectomy delays alveolar wound healing after molar extractions in rats. *J Oral Maxillofac Surg* 2007;65(11):2248-53.

Pérez-Castrillón JL, Justo I, Silva J, Sanz A, Igea R, Escudero P, et al. Bone mass and bone modeling markers in hypertensive postmenopausal women. *J Hum Hypertens* 2003;17:107-10.

Prakasam G, Yeh JK, Chen MM, Castro-Magana M, Liang CT, Aloia JF. Effects of growth hormone and testosterone on cortical bone formation and bone density in aged orchietomized rats. *Bone* 1999;24(5):491-7.

Rabeque FC, Carvalho MM, Araújo VC, Luz JGC. Resposta tecidual frente a defeito cirúrgico no ramo da mandíbula de ratos. *RPG Rev Pós Grad* 2002;9(1):57-62.

Redlich K, Pietschmann P, Stule T, Peterlik M. Comparative study on the effect of calcium channel blockers on basal and parathyroid hormone-induced bone resorption *in vitro*. *Pharmacol Toxicol* 1997;80:262-5.

Reim NS, Breig B, Stahr K, Eberle J, Hoeflich A, Wolf E, et al. Cortical bone loss in androgen-deficient aged male rats is mainly caused by increased endocortical bone remodeling. *J Bone Miner Res* 2008;23:694-704.

Ritchie CK, Maercklein PB, Fitzpatrick LA. Direct effect of calcium channel antagonists on osteoclast function: alterations in bone resorption and intracellular calcium concentrations. *Endocrinology* 1994;135:996-1003.

Rodrigues L, Miyazaki LT, Luz JGC. Consequências no crescimento de maxila e mandíbula de defeito ósseo cirúrgico no ramo da mandíbula de ratos. *Acta Cir Bras* 2004;19(5):523-8.

Samnegard E, Sjöden G. Verapamil induces increased bone volume and osteopenia in female rats but has the opposite effect in male rats. *Calcif Tissue Int* 1992;50:524-6.

Takahashi T, Kanda T, Imai S, Suzuki T, Kobayashi I, Nagai R. Amlodipine inhibits the development of right ventricular hypertrophy and medial thickening of pulmonary arteries in a rat model of pulmonary hypertension. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 1996;91(1):17-32.

Teófilo JM, Brentegani LG, Lamano Carvalho TL. A histometric study in rats of the effect of the calcium antagonist amlodipine on bone healing after tooth extraction. *Arch Oral Biol* 2001;46(1):375-9.

Tsuda K, Nishio I, Masuyama Y. Bone mineral density in women with essential hypertension. *Am J Hypertens* 2001;14:704-7.

Valcárcel Y, Jiménez R, Hernández V, Arístegui R, Gil A. Efficacy and safety of amlodipine. A comparative study of hypertensive patients treated at primary- and specialised-care centres. *Clin Drug Invest* 2006;26(3):125-33.

van Zwieten PA. Amlodipine: an overview of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties. *Clin Cardiol* 1994;17(9 Suppl 3):3-6.

Wang TM, Hsu JF, Jee WS, Matthews JL. Evidence for reduced cancellous bone mass in the spontaneously hypertensive rat. *Bone Miner* 1993;20(3):251-64.

Wiens M, Etminan M, Gill SS, Takkouche B. Effects of antihypertensive drug treatments on fracture outcomes: a meta-analysis of observational studies. *J Intern Med* 2006;260:350-62.

Yamazaki T, Komuro I, Zou Y, Kudoh S, Shiojima I, Mizuno T, et al. Efficient inhibition of the development of cardiac remodeling by a long-acting calcium antagonist amlodipine. *Hypertension* 1998;31(1):32-8.

Yao W, Cheng Z, Koester KJ, Ager JW, Balooch M, Pham A, et al. The degree of bone mineralization is maintained with single intravenous bisphosphonates in aged estrogen deficient rats and is a strong predictor of bone strength. *Bone* 2007;41(5):804-12.

Zanetti-Elshater F, Pingitore R, Beretta-Piccoli C, Reisen W, Heinen G. Calcium antagonists for treatment of diabetes-associated hypertension: metabolic and renal effects of amlodipine. *Am J Hypertens* 1994;7:36-45.

ANEXO A – Valores dos níveis de fosfatase alcalina e cálcio séricos observados em ratos sadios, sem fraturas, utilizados como controle negativo do biotério de Cirurgia da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, assim como valores de referência de Mitruka e Rawnsley (1977)

	Cálcio (mg/dL)	Fosfatase alcalina (U/L)
Controle negativo	9,93±0,11	46,0±14,2
Valores de referência	7.2-13.9	56.8-128

ANEXO B - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da FOU SP

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA****PARECER DE APROVAÇÃO****PROTOCOLO nº 11/07**

Com base em parecer de relator, o Comitê de Ética em Pesquisa – Subcomissão de Bioética de Animais da FOU SP, APROVOU o protocolo de pesquisa **“Efeitos do bloqueador de canais de cálcio amlodipina na reparação óssea em defeito cirúrgico no ramo mandibular de ratos”**, de responsabilidade do pesquisador Rogério Bonfante Moraes, sob orientação da Professor(a) Doutor(a) Prof. Dr. João Gualberto de Cerqueira Luz.

Cabe ao responsável enviar relatórios referentes ao andamento da pesquisa após 06 (seis) meses e 01(um) ano desta data, bem como cópia do trabalho em “cd” ou “disquete” ao finalizá-lo, conforme legislação vigente.

São Paulo, 18 de julho de 2007

Prof. Dr. **CELSON LUIZ CALDEIRA**
PRESIDENTE DA SUBCOMISSÃO DE BIOÉTICA DE ANIMAIS DA FOU SP