

AÇÃO DA NIFEDIPINA SOBRE O PERFIL CATIÔNICO DO MIOCÁRDIO E MÚSCULO ESQUELÉTICO DE RATOS NORMO E HIPERTENSOS (SHR)

EVA MARIA AUGUSTA BOECKN HAEBISCH*, CARMEN CASTILHO ALONSO**

Com a avaliação das concentrações catiônicas teciduais (em espectrofotômetro de absorção atômica), verificaram-se significantes variações entre tecidos obtidos de ratos normotensos (NWR) e hipertensos (SHR) e sua reação e tratamento com nifedipina (Oxcard®), 10mg/dia, durante 10 dias, via intubação gástrica.

O miocárdio e o músculo esquelético de animais NWR são ricos em Ca^{2+} e Mg^{2+} , aparecendo esses cátions em baixas concentrações em tecidos de animais SHR. Embora o músculo esquelético de NWRs seja rico em K^+ , os SHRs apresentam teores significativamente maiores desse íon no mesmo tecido. Altas concentrações de Zn^{2+} foram encontradas nos tecidos de animais SHRs.

Com a administração de nifedipina, houve aumento de peso corporal somente em animais NWR; um discreto efeito hipotensor foi verificado em SHRs no 2.º dia de tratamento e em NWRs no 3.º dia.

Em NWRs, a nifedipina provocou diminuição da concentração de Zn^{2+} em miocárdio e de Na^+ e K^+ em músculo esquelético. Em SHRs não foram alteradas as concentrações catiônicas no miocárdio; no músculo esquelético houve depleção de Ca^{2+} e retenção de K^+ .

Os resultados obtidos de mamíferos tratados com nifedipina diferem daqueles obtidos de anfíbios. Nesta espécie, a nifedipina provocou depleção de Ca^{2+} e Mg^{2+} e retenção de K^+ , tanto em miocárdio como em músculo esquelético, mostrando, portanto, um efeito semelhante em músculo esquelético (gastrocnemius) de anfíbios e de ratos SHRs.

Concluindo, o efeito da nifedipina sobre o miocárdio e músculo esquelético está relacionado com as concentrações ionais teciduais pré-existentes que por sua vez dependem, em parte, da distribuição iônica e da atividade de enzimas cátion dependentes.

A nifedipina, um derivado da diidropiridina, é um bloqueador dos canais lentos de cálcio¹⁻³. Questiona-se sua ação em tecidos contráteis predominantemente de canais rápidos. Na^+ - dependentes, como miocárdio e músculo esquelético.

Em anfíbios⁴, a nifedipina administrada oralmente causou, em tais tecidos, depleção de cálcio e magnésio e retenção de potássio. Nessa espécie, a homeostase eletrolítica tecidual sofreu alterações semelhantes no miocárdio e no músculo esquelético, as quais são atribuídas a modificações da permeabilidade das membranas celulares.

O transporte iônico transmembrana depende do equilíbrio funcional de muitos fatores, tais como estrutura da membrana (sarcolema e glicocálix), estrutura celular (retículo sarcoplasmático, mitocôndrias), ativi-

dade enzimática da membrana (Na^+ - K^+ ATPase), atividade enzimática intracelular (Ca^{2+} - Mg^{2+} ATPase e outros) e concentrações e gradientes eletrolíticos, intra-extracelulares. A distribuição e concentração catiônica tecidual, pode servir como indicador de que esses e outros fatores estão sob influência de condições genéticas, fisiopatológicas e medicamentosas.

Em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) são encontradas alterações da fixação de cálcio nas membranas citoplasmáticas do miocárdio⁵. Também, o transporte de cálcio e o fluxo de cálcio Na^+ - dependente são diferentes em SHR⁶. Nós confirmamos variações significativas: no miocárdio e músculo esquelético de animais SHR existem baixas concentrações de cálcio, associadas a baixa concentração de magnésio e elevada concentração de zinco.

Trabalho realizado no Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP.

* Professora-Assistente-Doutora do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da SP.

** Professora- Livre-docente do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP.

Em estudos realizados a nível celular em miocárdio de ratos normo e hipertensos, usando membranas sarcoplasmáticas isoladas, verificou-se que a nifedipina não modifica o mecanismo de fixação de cálcio, dependente de 5' nucleotidase e da $\text{Na}^+ \text{K}^+ - \text{ATPase}$, nas membranas citoplasmáticas do miocárdio. Somente em animais SHR, a nifedipina acentuou o transporte de cálcio. ATP-dependente, aumentando suas concentrações intravesiculares. O maior acúmulo de cálcio levou a uma acentuada extrusão desse íon por permeabilidade passiva⁷.

A permeabilidade para íons é facilitada pela ativação de fosfolipases e proteases do sarcolema, o que afeta a estrutura da membrana⁸, comprometendo sua função.

No presente modelo experimental foi estudado o efeito da nifedipina sobre as concentrações de diversos eletrólitos, além do cálcio, no miocárdio e no músculo esquelético de ratos normo (NWR) e hipertensos (SHR), na tentativa de contribuir para o esclarecimento de assunto tão polêmico.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados ratos Wistar, machos, adultos, divididos em dois grupos: 30 animais normotensos (NWR), com peso médio de 239 ± 23 g e 26 animais com hipertensão espontânea (SHR/N/epm) com peso médio de 240 ± 8 g. A pressão arterial média durante os 10 primeiros dias de experimentação, medida por esfigmomanometria caudal após aquecimento de curta duração, era de $12,1 \pm 1,4$ cm Hg para o primeiro grupo e de $15,1 \pm 1,5$ cm Hg para o segundo.

Para a metade dos animais NWRs e SHRs, foi administrada nifedipina (10 mg/dia de Oxeord^R triturada e emulgada em 1,5 ml de água), via intubação gástrica, durante 10 dias. A outra metade de animais recebeu diariamente 1,5 ml de água também por via intragástrica e formaram o grupo controle.

Após o período de administração, os animais foram sacrificados por decapitação para obtenção de amostras de sangue e de tecidos. De cada animal foram recolhidas quatro amostras de ventrículos e do músculo esquelético (lado esquerdo do gastrocnêmio). As preparações dos tecidos de animais- controle e tratados dos dois grupos (NWR e SHR) foram efetuadas simultaneamente, para posterior análise eletrolítica em espectrofotômetro de absorção atômica. As amostras de sangue foram analisadas como sangue total.

As concentrações catiônicas em mmoles/g de tecido fresco (úmido) de cálcio (Ca^{2+}), magnésio (Mg^{2+}), zinco (Zn^{2+}), sódio (Na^+) e potássio (K^+) foram calculadas em base em retas de regressão linear obtidas da leitura de solutos-padrão. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste "t" não pareado de Student, com nível de significância de 1 a 5%.

RESULTADOS

Peso corporal - Logo no início do tratamento com a nifedipina, o peso corporal dos animais NWR aumentou em 15 - 20 g e permaneceu alto durante todo o período de administração da droga, enquanto os SHR aumentaram seu peso corporal inicial somente em redor de 7 g (fig. 1A).

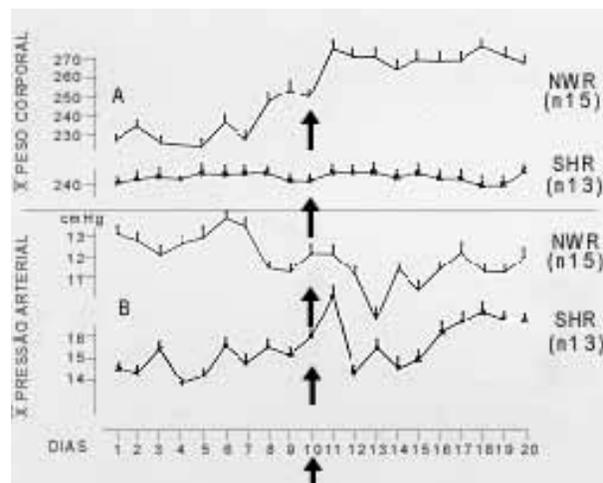


fig. 1 - Variação da média do peso corporal (A) e da pressão arterial (B) durante o período de experimentação. O início do tratamento com nifedipina (10mg/dia) via intubação gástrica, durante 10 dias, está indicado por flexa.

Pressão arterial (PA) - A administração de nifedipina provocou ligeira hipotensão nos animais NWR somente no início do tratamento; após 10 dias de administração, a PA desses animais oscilava ao redor dos valores iniciais. No 1.º dia de administração de nifedipina aos animais SHR houve aumento da PA, seguindo de queda no 2.º dia. Ao final do tratamento, esses animais apresentavam valores ligeiramente maiores que os iniciais (fig. 1B).

Água e eletrólitos (tab. I). - Após a administração de nifedipina, a concentração de água tecidual mostrou-se discretamente reduzida somente em miocárdio de animais SHR.

Comparando-se os resultados obtidos nos animais-controle SHR e animais controle NWR, verifica-se que, tanto em miocárdio como em músculo esquelético, os SHR apresentam menores concentrações de Ca^{2+} e Mg^{2+} e maiores de Zn^{2+} . Nesses animais o Na^+ se apresentava reduzido no miocárdio e o K^+ aumentado no músculo esquelético.

A nifedipina provocou, no miocárdio de animais NWR, redução da concentração de Zn^{2+} , enquanto que, no músculo esquelético, houve diminuição dos teores de Na^+ e K^+ .

Nos animais SHR, a nifedipina não provocou qualquer alteração eletrolítica no miocárdio; no músculo esquelético verificou-se diminuição de Ca^+ e aumento de K^+ .

Quocientes $[K^+][Na^+]$ e $[Na^+]x[K^+]/[Ca^{2+}]x[Mg^{2+}]$ - Em ambos os grupos de animais, esses quocientes se apresentaram maiores no músculo esquelético do que no miocárdio. Por outro lado, tais quocientes foram maiores nos animais SHR que nos animais NWR. Pela ação da nifedipina, os quocientes sofreram ainda maior aumento nos animais SHR, enquanto nos animais NWR houve uma tendência para diminuição (fig. 2).

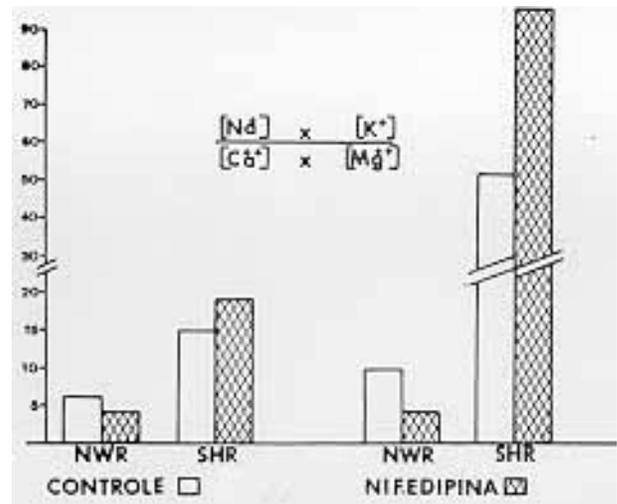
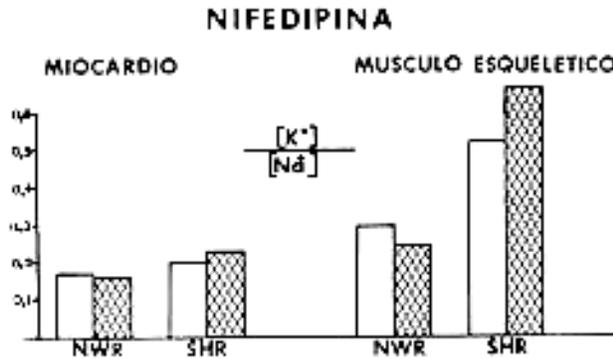


Fig. 2 - Os quocientes $[K^+][Na^+]$ e $[Na^+]x[K^+]/[Ca^{2+}]x[Mg^{2+}]$ são indicadores da homeostase catiônica tecidual. Os quocientes são maiores no músculo esquelético de animais hipertensos (SHR) e aumentam ainda mais pelo tratamento com nifedipina, principalmente em consequência da diminuição do produto $[Ca^{2+}]x[Mg^{2+}]$

Tabela 1 - Concentrações eletrolíticas no miocárdio e no músculo esquelético de ratos normo (NWR) e hipertensos (SHR) controles e tratados com nifedipina (10 mg/dia, durante 10 dias, via intubação gástrica).

	Miocárdio						H ₂ O%	Músculo Esquelético				
	H ₂ O%	mmoles/g tecido fresco						mmoles/g tecido fresco				
		Ca ²⁺	Mg ²⁺	Zn ²⁺	Na ⁺	K ⁺		Ca ²⁺	Mg ²⁺	Zn ²⁺	Na ⁺	K ⁺
NWR												
Controles	78,4 ± 1,3	10,8 ± 2,3	14,5 ± 3,1	0,4 ± 0,03	73,2 ± 9,8	12,3 ± 3,1	75,4 ± 1,4	9,7 ± 2,1	10,6 ± 2,1	0,3 ± 0,08	60,8 ± 9,1	17,9 ± 3,9
Nifedipina	79,5 ± 1,4	11,1 ± 1,9	17,0 ± 3,8	0,3 ± 0,04 **	74,1 ± 7,0	12,0 ± 2,6	76,9 ± 0,9	11,0 ± 3,0	11,8 ± 2,4	0,3 ± 0,07	50,9 ± 8,2 **	12,2 ± 4,1 **
SHR												
Controles	82,2 ± 2,0	6,3 ± 1,5 *	5,8 ± 1,4 *	0,6 ± 0,07	51,9 ± 7,5 *	10,5 ± 2,2	78,5 ± 0,5	5,0 ± 1,1 *	7,3 ± 1,0 *	0,7 ± 0,1 *	60,2 ± 5,0	31,3 ± 5,1 *
Nifedipina	78,0 ± 4,8	5,8 ± 1,3	6,4 ± 1,8	0,5 ± 0,1	54,2 ± 9,0	12,5 ± 3,5	78,4 ± 0,9	3,5 ± 0,9 **	7,8 ± 1,0	0,7 ± 0,2	63,3 ± 8,0	41,8 ± 7,5 **

Controles MWR x Controles SHR = p < 0,05; Controles (SHR e NWR) x Tratados = (SHR e NWR) = ** p < 0,05.

DISCUSSÃO

Comparando-se o perfil catiônico de NWRs e SHRw, verificaram-se acentuadas e significativas alterações nas concentrações eletrolíticas teciduais de SHRs. Essas alterações foram semelhantes para os cátions bivalentes em miocárdio e músculo esquelético: reduzidas concentrações de Ca²⁺ e Mg²⁺ e altas concentrações de Zn²⁺. Os cátions monovalentes estiveram presentes em SHRs em diferentes concentrações: Na⁺ reduzido no miocárdio e K⁺ aumentado no músculo esquelético.

Ao se planejar o estudo, esperava-se que a nifedipina tivesse um efeito benéfico regulador sobre os tecidos de SHRs, normalizando as alterações de composição eletrolítica, geneticamente determinadas.

Com base em estudos realizados em membranas isoladas de miocárdio, David e col.⁷ concluíram que a nifedipina age exclusivamente sobre membranas celulares de ratos geneticamente hipertensos (SHR) e não em animais normotensos.

Os resultados obtidos mostram que a nifedipina, pela sua ação sistêmica, não modifica visivelmente os teores catiônicos da hipertensão no miocárdio, mas no músculo esquelético acentua ainda mais a depleção de Ca²⁺ e a retenção de K⁺ SHR-dependentes. Esse efeito da nifedipina foi também observado no músculo gastrocnêmio de rãs⁴.

Os quocientes $[K^+]/[Na^+]$ e $[Na^+]x[K^+]/[Ca^{2+}]x[Mg^{2+}]$, indicadores da homeostase catiônica tecidual mostraram que, em princípio, o efeito da nifedipina é semelhante no miocárdio e no músculo esquelético, diferindo apenas em intensidade. No entanto, esse efeito é totalmente diferente nos dois grupos de animais (NWR e SHR). A ação da nifedipina em SHRs por nós observada principalmente em músculo esquelético, não é um efeito atenuante sobre os mecanismos envolvidos e alterados na hipertensão mas, ao contrário, uma acentuação dessas alterações. Em NWRs, a nifedipina causou diminuição significativa dos quocientes no músculo esquelético, resultante de depleção de sódio e potássio, acompanhada de discreta tendência para retenção de cálcio e magnésio.

A captação e liberação iônica de células, independente de sistemas enzimáticos, são reguladas pelos gradientes de concentração e influenciadas também por outros fatores que modificam a permeabilidade da membrana celular (insulina, catecolaminas, histamina, renina, angiotensina, aldosterona, etc.).

As concentrações iônicas teciduais e especialmente os processos energéticos de transporte iônico são catalisados pela cinética enzimática. A extrusão de cálcio é, em parte, regulada pela Ca^{2+} ATPase do sarcolema; a captação de Ca^{2+} no retículo sarcoplasmático depende da atividade da Ca^{2+} - Mg^{2+} ATPase⁸.

Nos tecidos de SHR, as reduzidas concentrações de Ca^{2+} e Mg^{2+} são a expressão de uma diminuída captação e/ou estimulada extrusão de cálcio⁹⁻¹⁰. Se no músculo esquelético de SHR a nifedipina depleta cálcio, diminuindo ainda mais sua concentração tecidual sem alterar a concentração de Mg, deve-se supor que essa depleção se deva à estimulação do mecanismo de extrusão (Ca^{2+} - ATPase-dependente) e não à inibição do mecanismo de captação (Ca^{2+} - Mg^{2+} - ATPase - dependente).

No caso do miocárdio de SHR e do miocárdio e do músculo esquelético de NWR, onde a nifedipina não alterou as concentrações pré-existent de cálcio, talvez os dois mecanismos estejam estimulados. Corroborando essa hipótese o fato de existir uma tendência para a retenção de magnésio nesses tecidos.

A depleção de cátions bivalentes provocada pela nifedipina no miocárdio e no músculo esquelético de rãs⁴ leva à suposição de que, nessa espécie, o sistema (enzimas?) de captação seja diferente e insensível à nifedipina; desse modo a droga estimularia o mecanismo de extrusão catiônica, sem afetar o mecanismo de captação.

O efeito inotrópico negativo da nifedipina, observado em preparações de corações isolados de várias espécies, inclusive em anfíbios⁴, é atribuído à depleção de cálcio. Essa depleção pode ser conseqüência de alterações enzimáticas nas condições de perfusão. Desse modo, o mecanismo de captação estaria insensível à nifedipina e predominaria, então, a estimulação do mecanismo de extrusão.

A redução da concentração de Ca^{2+} intracelular, especificamente na superfície interna da membrana, resulta em retardada ativação da condutância de K^{+11} , o que pode ser observado pela retenção tecidual desse íon, principalmente em músculo esquelético de ambas as espécies.

SUMMARY

The analysis of cationic distribution in tissues, carried out by atomic absorption spectrophotometry, revealed significant variations in tissues, obtained from normotensive (NWR) and spontaneously hypertensive rats (SHR), which also responded differently to treatment with nifedipine, as compared the control groups.

Normotensive animals had a high calcium and magnesium ion concentrations in myocardial and skeletal muscles, while in SHR these were significantly reduced. The skeletal muscle from NWRs was rich in potassium, but was even more increased in SHRs. In SHR the zinc concentration was increased in the myocardial and skeletal muscle.

Nifedipine was applied by means of a intragastric tube (10 mg/day during a 10 day period) to NWRs and SHRs. During treatment, mean body weight increased only in the NWR-group. A hypotensive effect on the blood pressure was observed in SHR on the second day and in NWRs on the third day of treatment.

Nifedipine in NWRs provoked a reduction of the zinc concentration in the myocardium and a depletion of sodium and potassium in the skeletal muscle. In the myocardium of SHRs, the cationic concentration was not altered, but in the skeletal muscle there was a reduction of calcium ions and retention of potassium.

The effects of nifedipine are different in mammalian and amphibians tissue. However in amphibians (Rana castebiana Shaw) nifedipine also caused calcium (and magnesium) reduction and potassium retention in the myocardium and skeletal muscle. There was a similar effect in the gastrocnemius of amphibians and spontaneously hypertensive rats. We concluded, that the effect of nifedipine on myocardial and skeletal muscle is related to the pre-existent ion tissue concentration which finally is related to cation-dependent enzyme distribution and activity.

REFERÊNCIAS

1. Fleckenstein, A.; Tritthart, H.; Doering, H. J.; Byon, K. Y. - Ein hochaktiver Ca^{2+} antagonistischer inhibitor der elektromechanischen koppelungsprozesse im Warmblueter-Myokard. *Arz neim. Forschung. Drug, Res.* 22: 22. 1972.
2. Kohlhardt, M.; Fleckenstein, A. - Inhibition of the slow inward current by nifedipine in mammalian ventricular myocardium. *Naunyn-Schmiedeb. Arch. Pharmacol.* 292: 267, 1977.
3. Nayler, W. G.; Poole-Wilson, Ph. - Calcium antagonists: definition and mode of action. *Basic Res. Cardiol.* 76: 1, 4981.
4. Boeckh-Haebisch, E. M. A.; Vallada Genofre, M.; Castilho Alonso, C. - Ação da nifedipina "in vitro" sobre as funções cardiovasculares, "in vitro" e "in situ" sobre perfil catiônico da aorta, miocárdio e músculo esquelético em rãs (Rana castebiana Shaw). *Arq. Bras. Cardiol.* 48: 35, 1987.
5. Devynck, M. A.; Pernollet, M. G.; Nunez, A. M.; Meyer, P. - Analysis of Ca^{2+} handling in erythrocyte membrane of genetically hypertensive rats. *Hypertension*, 3: 397. 1981.
6. Pernollet, M. G.; Devynck, M. A.; Meyer, P. - Abnormal calcium handling by isolated cardiac plasma membrane from spontaneously hypertensive rats. *Clin. Sci.* 61: 45s, 1981.
7. David-Dufilho, M.; Devynck, M. A.; Kazda, S. T.; Meyer, P. H. - Stimulation by nifedipine by cardiac sarcolemmal vesicles from spontaneously hypertensive rats. *Eur. Pharmacol.* 97: 121, 1984.
8. Batlouni, M. - Bloqueadores dos canais de cálcio. *Arq. Bras. Cardiol.* 44:423, 1985.
9. Parrot-Garcia, M. P. H.; Mc Carron, D. A. - Calcium and hypertension. *Nutr. Rev.* 42: 205. 1984.
10. Altura, B. M.; Altura B. T.; Gebrewold, A.; Ising, H.; Gunther, T. - Magnesium deficiency and hypertension correlation between magnesium deficient diets and microcirculatory changes in situ. *Science*, 223: 1315, 1984.
11. Isenberg, G. - Is potassium conductance of cardiac Purkinje fibres controlled by Ca^{2+} ? *Nature*, 253: 273. 1975.