

COMPARAÇÃO DO CRONOTROPISMO NEGATIVO DA NITRENDIPINA, NIFEDIPINA E VERAPAMIL NO ÁTRIO DIREITO ISOLADO DE RATOS NORMOTENSOS E COM HIPERTENSÃO RENOVASCULAR

MARIA DAS GRAÇAS DE FARIA, CLÁUDIA MENDES LEITE, JOSÉ GUILHERME PINHEIRO PIRES, JOSÉ GERALDO MILL
Vitória, ES

Objetivo – Estudar o efeito cronotrópico negativo de nitrendipina, nifedipina e verapamil no átrio direito isolado de ratos normotensos e com hipertensão renovascular.

Material e Métodos – A hipertensão foi produzida pela implantação de anel de prata na artéria renal esquerda e nefrectomia direita. Os animais foram estudados 15 dias após a cirurgia, quando a PA média (medida diretamente, no animal acordado, através de cânula intravascular) do grupo hipertenso (154 ± 4 mmHg) era maior que a do grupo controle (109 ± 2 mmHg). A frequência atrial “in vitro” foi determinada a partir dos registros das contrações isométricas. Átrios diferentes foram usados para se obter as curvas dose-resposta ($0,01 \mu\text{M}$ - $100 \mu\text{M}$) de cada droga.

Resultados – A frequência atrial “in vitro” foi idêntica nos normotensos (243 ± 7 bpm) e hipertensos (245 ± 5 bpm). A sensibilidade às drogas testadas também foi a mesma, em ambos os grupos. A concentração de droga necessária para reduzir 50% da frequência sinusal foi cerca de $2 \mu\text{M}$ para o verapamil, $4 \mu\text{M}$ para a nitrendipina e $20 \mu\text{M}$ para a nifedipina.

Conclusão – A hipertensão não altera a sensibilidade do marca-passo sinusal aos bloqueadores de canal de cálcio. O efeito cronotrópico negativo da nitrendipina é intermediário entre o do verapamil e o da nifedipina.

Palavras-chave: Bloqueadores de canais de cálcio; hipertensão; frequência cardíaca.

NITRENDIPINE, NIFEDIPINE AND VERAPAMIL: A COMPARISON OF THE NEGATIVE CHRONOTROPIC EFFECTS USING THE ISOLATED RIGHT ATRIA FROM NO RMOTE N SIVE AND RE NOVA S CULAR HYPERTENSIVE RATS.

Purpose – To study the negative chronotropic effects of nitrendipine, nifedipine and verapamil in isolated right atria from normotensive and renovascular hypertensive rats.

Material and Methods – Hypertension (medium arterial pressure, MAP = 154 ± 4 mmHg) was induced by applying a silver clip to the left renal artery and right nephrectomy. Control rats (MAP = 109 ± 2 mmHg) were submitted to right nephrectomy only. The animals were studied 2 weeks after surgery. Different preparations were used to obtain cumulative dose-response curves ($0,01 \mu\text{M}$ to $100 \mu\text{M}$) with each drug.

Results – No difference in “in vitro” initial sinus rate of control (243 ± 7 bpm) and hypertensive (245 ± 5 bpm) rats was observed. The negative chronotropic response produced by calcium channel blockers was similar in normotensive and hypertensive groups. $2 \mu\text{M}$ verapamil, $4 \mu\text{M}$ nitrendipine or $20 \mu\text{M}$ nifedipine was necessary to produce a 50% decrease of the initial sinus rate.

Conclusion – Sensitivity of the sinusal pacemaker to calcium antagonists does not change in this model of hypertension. Moreover, the negative chronotropic effect of nitrendipine is stronger than nifedipine and weaker than verapamil.

Key-words: Calcium channel blockers; hypertension, cardiac rate.

Arq Bras Cardiol 56/3:189-192 – Março 1991

Faculdade de Farmácia e Bioquímica e Departamento de Ciências Fisiológicas do Centro Biomédico da Universidade Federal do Espírito Santo.

Correspondência: José Geraldo Mill – Departamento de Ciências Fisiológicas – Centro Biomédico da UFES. Caixa Postal 780 – 29001 – Vitória, ES.

Os bloqueadores dos canais de cálcio reduzem a corrente de entrada deste íon nas células musculares lisas e cardíacas ligando-se a receptores específicos da membrana celular¹. Três sítios receptores independentes, um para as dihidro-

piridinas (nifedipina), outro para as difenilalquilaminas (verapamil), e um terceiro para o diltiazem já foram identificados². Estudos recentes sugerem que estes receptores fazem parte da própria superestrutura protéica do canal de cálcio³. A nifedipina foi o primeiro derivado dihidropiridínico a ser usado no tratamento da hipertensão arterial⁴. Entretanto, o número de compostos deste grupo químico em uso pré-clínico e clínico tem aumentado continuamente⁵, na tentativa de se identificar agentes que atuem de modo mais seletivo em determinados territórios vasculares e que não apresentem os efeitos indesejáveis da nifedipina, como a taquicardia reflexa. A nitrendipina é um derivado dihidropiridínico cujo emprego na hipertensão arterial poderia ser mais vantajoso pois, aliado ao efeito vasodilatador, também determina natriurese^{6,7}.

A comparação do efeito cronotrópico negativo dos bloqueadores de cálcio "in vivo" é dificultada pelo fato de que a ação direta da droga no nódulo sinusal geralmente é modificada pelos ajustes reflexos do tono simpático³. Estas influências do sistema nervoso autônomo podem ser eliminadas utilizando-se, para tais estudos, preparações "in vitro", desprovidas de interação. Assim sendo, utilizamos o átrio direito isolado de rato para se comparar o efeito cronotrópico negativo da nitrendipina com o da nifedipina e o do verapamil. Considerando que alguns estudos têm sugerido possível aumento da densidade de receptores dihidropiridínicos^{9,10} e de canais de cálcio¹¹ no miocárdio de ratos com hipertensão arterial, estudamos animais normotensos e com hipertensão renovascular.

MATERIAL E MÉTODOS

Sessenta ratos albinos machos e fêmeas com 9 a 12 semanas de idade (190 a 260 g) com hipertensão renovascular produzida sob anestesia com éter, através da implantação de um anel de prata (diâmetro interno, 0,2 mm) em torno da artéria renal esquerda, seguida de nefrectomia direita. Duas semanas após, os animais foram novamente anestesiados com éter para implantação de uma cânula de polietileno na artéria femoral esquerda. A cânula era dirigida ao longo do espaço subcutâneo até o dorso da região cervical onde era exteriorizada e fixada. A pressão arterial (colhida através de transdutor Statham P23Dd) foi medida de 5 a 12 horas após a implantação da cânula, nos animais acordados e com livre movimentação no interior da gaiola. A frequência cardíaca (FC) foi determinada a partir

do registro da pressão arterial pulsátil. A pressão arterial média (PAM) foi obtida eletronicamente. Foram incluídos no grupo hipertenso apenas os animais com PAM superior a 125 mmHg.

Após mensuração dos parâmetros hemodinâmicos, os animais foram sacrificados por decapitação e o coração imediatamente retirado e transferido para a placa de Petri para dissecação do átrio direito e seio venoso, preservando-se ao máximo as estruturas que circundam o marcapasso sinusal. Em seguida, o átrio era transferido para a cuba de experimentação (volume, 7 ml) e perfundido com solução de Locke (composição, em mM, NaCl = 154; KCl = 5,6; CaCl₂ = 2,16; NaH₂PO₄ = 0,08; NaHCO₃ = 1,9 e Glicose = 5,55), continuamente aerada com oxigênio e mantida a 36 ± 0,5°C. O átrio era fixado ao fundo da câmara com estiletos de prata e conectado a um transdutor de força (Narco) sob estiramento constante de 0,5 h. A frequência sinusal foi determinada a partir das contrações isométricas registradas em polígrafo (Narco DPM-4B).

A curva dose-resposta para cada um dos bloqueadores de cálcio era obtida após período de estabilização de cerca de 30 min. Cada átrio foi testado em presença de apenas um bloqueador de cálcio. As drogas eram adicionadas à cuba acumulativamente a partir de soluções concentradas (0,1 M) mantidas em estoque. O verapamil foi inicialmente dissolvido em água destilada e as dihidropiridinas em mistura volumétrica (v/v) de etanol (95%), polietilenoglicol 600 (4%) e Tween 80 (1%). A diluição final das soluções-estoque era feita com Locke. O efeito cronotrópico negativo do diluente das dihidropiridinas foi testado separadamente em 6 átrios de ratos normais. Na maior concentração do diluente, ocorreu redução de 16,3% da frequência sinusal inicial (245 ± 13 para 205 ± 5 batimentos por minuto, P < 0,05. Para o cálculo dos valores de EC50 (concentração de droga necessária para reduzir 50% da frequência inicial) da nifedipina e nitrendipina fez-se a subtração, ponto a ponto, do efeito inotrópico negativo do diluente. Os experimentos com as dihidropiridinas foram conduzidos com proteção adequada contra a luz.

A verificação de significância de diferença entre médias foi feita pelo teste "t" de Student para amostras independentes. Os dados são fornecidos como médias ± erro padrão da média.

RESULTADOS

Os dados de hemodinâmica são apresentados na tabela I. No conjunto dos animais

hipertensos (n = 28), a FC média foi de 384 ± 7 bpm, cerca de 11% maior que nos ratos controles (345 ± 6 bpm, ($P < 0,01$)). A PAM foi 41% maior nos hipertensos em relação aos normotensos (154 ± 4 mmHg e 109 ± 2 mmHg), respectivamente, ($P < 0,01$). O maior valor de FC "in vivo" dos ratos com hipertensão renovascular não se manteve no átrio direito isolado. A frequência sinusal basal, isto é, após 30 min. de estabilização das preparações às condições de percussão "in vitro" e antes de qualquer tratamento, foi de 243 ± 7 bpm nos átrios dos normotensos e de 246 ± 5 bpm nos de hipertensos ($P < 0,05$).

A redução da frequência sinusal produzida por verapamil, nifedipina e nitrendipina é mostrada na figura 1. Como esperado, observou-se diminuição progressiva de FC com o aumento da concentração dos três bloqueadores de cálcio. Não se verificou diferença estatisticamente significativa no efeito cronotrópico negativo das drogas nos átrios de animais normotensos e hipertensos. A separação de curvas que parece ocorrer em baixas concentrações de verapamil, desaparece quando os dados são analisados em termos relativos (fig. 2). A acentuada redução de FC observada após tratamento com a primeira dose (0,01 μ M) de nifedipina e nitrendipina (fig.1), deve-se, em grande parte, ao efeito cronotrópico negativo do solvente. Nos 6 átrios onde o solvente das dihidropiridinas foi testado isoladamente, a frequência sinusal diminuiu de 245 ± 13 bpm para 219 ± 7 bpm, após adição ao banho da primeira dose. Essa queda (26 bpm) foi próxima à observada após tratamento com a menor dose de nifedipina ou nitrendipina (33 bpm, em média)

A partir das curvas dose-resposta normalizadas (fig.2), verifica-se que o EC50 do verapamil situa-se em torno de 2 μ M. O cálculo para as dihidropiridinas foi feito subtraindo-se, em cada concentração de droga, a média do efeito cronotrópico negativo do solvente. Pode-se en-

tão estimar que o EC50 da nitrendipina situa-se próximo a 4 μ M e o da nifedipina a 20 μ M.

DISCUSSÃO

A hipertensão arterial tem etiologia variável e efeitos complexos. A alteração de certos parâmetros físico-químicos e bioquímicos depende da etiologia da hipertensão, enquanto que outros são decorrentes de adaptações aos níveis tensionais elevados¹². As alterações da homeostasia do cálcio no músculo liso vascular e o aumento da sensibilidade dos vasos aos agentes vasoconstrictores endógenos, parecem estar envolvidos na gênese da hipertensão¹³. Por outro lado, as alterações de receptores de membrana, tais como a diminuição da densidade de receptores β -adrenérgicos¹⁴ e a redução do número de receptores de cálcio no glicocálix¹⁵, seriam conseqüentes ao aumento da pressão arterial⁹. Usando 3H-nitrendipina como ligante dos receptores dihidropiridínicos, Ishii e col. detectaram aumento da densidade desses receptores no tecido cerebral de ratos com hiper-

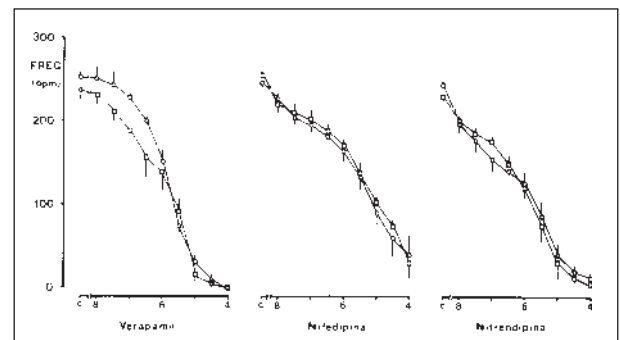


Fig. 1 - Redução da frequência sinusal (bpm) no átrio direito isolado e animais normotensos (●) e com hipertensão renovascular (○) em presença de verapamil (9,9), nifedipina (6,6) e nitrendipina (10,12). A concentração das drogas é dada em -log (Molaridade). C = controle. Os valores são fornecidos como média \pm epm.

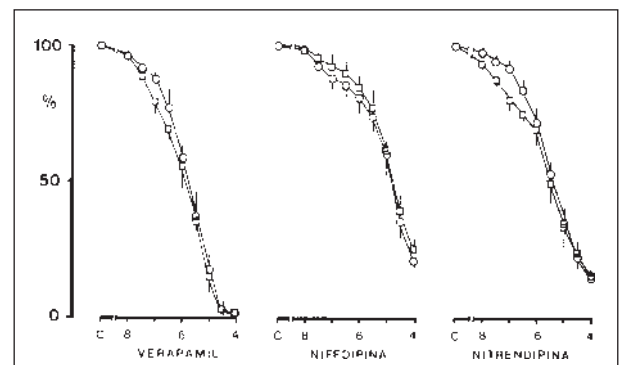


Fig. 2 - Redução percentual da frequência sinusal no átrio direito isolado de ratos normotensos (●) e hipertensos renovascular (○) em presença de verapamil, nifedipina ou nitrendipina. O número de animais em cada grupo é o mesmo da figura 1. As concentrações são dadas em -log (Molaridade) C = controle. Os valores são fornecidos como média \pm epm.

TABELA I — Pressão Arterial Média (PAM) e Frequência Cardíaca (FC) dos Ratos Controles (RC) e com Hipertensão Renovascular (RHR).						
	RC			RHR		
	FC (bpm)	PAM (mmHg)	n	FC (bpm)	PAM (mmHg)	n
Verapamil	340 ± 15	110 ± 4	9	370 ± 23	$151 \pm 7^*$	9
Nifedipina	351 ± 13	109 ± 3	7	386 ± 28	$158 \pm 9^*$	7
Nitrendipina	341 ± 8	108 ± 4	10	395 ± 36	$153 \pm 5^*$	12

Os valores de FC (batimentos/minuto) e PAM (mmHg) foram obtidos nos animais acordados e representam a média \pm epm. n = número de animais. (*) $P < 0,05$.

tensão espontânea (cepa SHR). Esse aumento não foi detectado em ratos jovens dessa mesma cepa, ainda na fase hipertensiva¹⁰. Esses achados sugeriam que o aumento dos receptores dihidropiridínicos poderia ser conseqüente à pressão arterial elevada. Nossos resultados não sugerem essa possibilidade, uma vez que a sensibilidade do marcapasso sinusal aos bloqueadores de cálcio foi idêntica no átrio isolado de animais normo e hipertensos. Parece, portanto, que a densidade e/ou a sensibilidade dos receptores nas células nodais não deve se alterar com a simples elevação da pressão arterial, pelo menos no modelo utilizado e ao longo do tempo abrangido neste estudo. Sendo assim, o aumento da densidade de receptores dihidropiridínicos em ratos SHR^{9,10} poderia ser conseqüente a outros fatores que não o simples aumento da pressão arterial, um deles a própria idade¹⁶. Usando-se ligantes mais seletivos para o receptor das dihidropiridinas (3H-Pn200-110) e das difenilalquilaminas (3H-desmetoxiverapamil, D888), mostrou-se que no envelhecimento há diminuição desses receptores no miocárdio. Na cepa SHR, esse decréscimo é menos acentuado, levando à falsa impressão de aumento com o desenvolvimento da hipertensão¹⁶.

Nossos resultados indicam que o efeito cronotrópico negativo dos bloqueadores de cálcio em indivíduos normo e hipertensos deve ser similar se as FC forem próximas. A maior redução de FC observada em indivíduos hipertensos^{8,17,19} seria decorrente dos diferentes níveis iniciais de FC e não a alterações da sensibilidade do marcapasso ao bloqueio dos canais de cálcio.

A comparação de potência (EC50) do verapamil com nifedipina e nitrendipina é complexa, devido à baixa hidrossolubilidade dessas últimas. Os solventes usados, como o etanol, por si só, deprimem o marcapasso sinusal. Os dados, entretanto, mostraram claramente que o efeito cronotrópico negativo da nitrendipina é menor que o do verapamil e maior que o da nifedipina. Considerando que o efeito vasodilatador dessas duas dihidropiridinas é similar²⁰ pode-se concluir que a taquicardia reflexa^{8,17,19,21} produzida pelo uso de nitrendipina deve ser menos acentuada do que a da nifedipina. Paralelamente, o efeito depressor da nitrendipina sobre a condução átrioventricular deve ser maior que o da nifedipina e menor que o do verapamil.

AGRADECIMENTOS

A Bayer (Brasil) pela cessão da nitrendipina e da nifedipina.

REFERÊNCIAS

1. Lee KS, Tsien RW – Mechanism of calcium channel block by verapamil, D600, diltiazem, and nitrendipine in single dialysed heart cells. *Nature*, 1983 302: 790-4.
2. Glossman H, Ferry DR, Goll A, Striessnig J, Zernig G – Calcium channels: introduction into their molecular pharmacology. In: Fleckensteins A, Van Breemen C, Gross R, Hoffmeister F. eds. Bayer Symposium IX: Cardiovascular effects of dihydropyridine type calcium antagonists and agonists. Berlin: Springer-Verlag, 1985: 113-39.
3. Flockerzi V, Oeken HJ, Hofmann F, Perlzer D, Cavalie A, Trautwein W – Purified dihydropyridine binding site from skeletal muscle tubules is a functional calcium channel. *Nature*, 326:66 8.
4. Olivari MT, Bartorelli C, Polese A, Fiorentini C, Guazzi M – Treatment of hypertension with nifedipine, a calcium antagonist agent. *Circulation*, 1979;59: 1056-63.
5. Meyer H, Wehinger E, Bossert F et al – Chemistry of dihydropyridines. In: Fleckenstein A, Van Breemen C, Gross R, Hoffmeister F. eds. Bayer Symposium IX: Cardiovascular effects of dihydropyridine type calcium antagonists and agonists. Berlin: Springer Verlag, 1985: 90-103.
6. Garthoff B, Kazda S, Knorr A – Nitrendipine increases sodium excretion acutely saline loaded rats. *Biochem Pharmacol*, 1982: 31:3015 6.
7. Weber MA, Drayer JIM – The calcium channel blocker nitrendipine in single and multiple-agent antihypertensive regimens: preliminary report of a multicenter study. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1984;6 (suppl. 7): 1077-83.
8. Nakaya H, Schwartz A, Millard RW – Reflex chronotropic and inotropic effects of calcium channel blocking agents in conscious dogs. *Circ Res*, 1983: 52: 302-11.
9. Ishii K, Kane T, Kurobe Y, Ando J – Binding of 3H nitrendipine to heart and brain membranes from normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Eur J Pharmacol*, 1983: 88: 277-8.
10. Chatelain P, Demol D, Roba J – Comparison of 3H nitrendipine binding to heart membranes of normotensive and spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1984: 6: 220 3.
11. Keung E – Calcium current is increased in isolated adult myocytes from hypertrophied rat myocardium. *Circ Res*, 1989: 64: 753-63.
12. Yasaki Y, Tsuchimochi H, Kurabayashi M, Komuro I – Molecular adaptation to pressure overload in human and rat hearts. *J Mol Cell Cardiol*. 1989: 21: 91-102.
13. Frohlich ED – Overview of hemodynamic and non hemodynamic factors associated with left ventricular hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol*, 1989;21 (suppl V): 3-10.
14. Limas C, Limas CJ – Reduced number of B adrenergic receptors in the myocardium of spontaneously hypertensive rats. *Biochem Biophys Res Commun*, 1978: 83: 710-4.
15. Devynck MA, Pernollet MG, Nunez AM – Diffuse structural alterations in cell membranes of spontaneously hypertensive rats. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1982; 79: 5057-62.
16. Dillon JS, Gu XH, Nayler WG – Effect of age and hypertrophy on cardiac Ca antagonists binding sites. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1989;14: 233-40.
17. Mill JG, Vassallo DV, Vasquez EC – Aspectos farmacológicos dos bloqueadores dos canais de cálcio: implicações terapêuticas. *Arq Bras Cardiol*, 1987;48:255 65
18. Vasquez EC, Mill JG, Cabral AM – Effects of verapamil on blood pressure and heart rate in neurogenic hypertensive rats. *Eur J Pharmacol*, 1984: 105: 215-9.
19. Robinson BF – Calcium entry blocking agents in the treatment of essential hypertension. *Am J Cardiol*, 1985; 55: 102B-6B.
20. Waltier DC, Gross GJ – Coronary and systemic hemodynamic effects of dihydropyridines. In: Fleckenstein A, Van Breemen C, Gross R, Hoffmeister F, eds. Bayer Symposium IX: Cardiovascular effects of dihydropyridine type calcium antagonists and agonists. Berlin: Springer Verlag, 1985: 338-52
21. Vasquez EC, Cabral AM, Mill JG, Moyses MR – Effects of nifedipine on blood pressure and heart rate in conscious neurogenic hypertensive rats. *Pharmacology*, 1988; 37: 370-5.