

**UnG**

---

**CEPPE**

**Centro de Pós-Graduação e Pesquisa**

**MESTRADO EM ODONTOLOGIA**

**ISAAC VASCONCELOS DE ARAÚJO**

**EFEITO DO TRATAMENTO COM LERCANIDIPINA  
NO REPARO E DENSIDADE ÓSSEA EM TÍBIAS DE  
RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS**

**GUARULHOS**

**2011**

**ISAAC VASCONCELOS DE ARAÚJO**

**EFEITO DO TRATAMENTO COM LERCANIDIPINA  
NO REPARO E DENSIDADE ÓSSEA EM TÍBIAS DE  
RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS**

**Dissertação apresentada à Universidade Guarulhos  
como requisito para obtenção do título de Mestre em  
Odontologia com Área de concentração em  
Periodontia**

**Orientadora: Profa. Dra. Marta Ferreira Bastos**

**Co-orientadora: Profa. Dra. Poliana Mendes Duarte**

**GUARULHOS**

**2011**

663e

ARAÚJO, Isaac Vasconcelos

Efeito do tratamento com lercanidipina no reparo e densidade óssea em tíbias de ratos espontaneamente hipertensos / Isaac Vasconcelos Araújo. Guarulhos, 2011.

51 f. : il. ; 31 cm

Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Centro de Pós-Graduação e Pesquisa, Universidade Guarulhos, 2011.

Orientador: Prof. Dra: Marta Ferreira Bastos

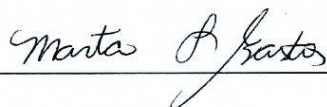
Bibliografia: f.

1. Lercanidipina. 2. hipertensão. 3. tecido ósseo. 4 SHR. 5. TRAP. I. Título. II. Universidade Guarulhos.

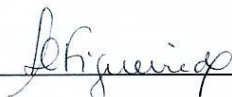
CDD 22<sup>st</sup> 617.6

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de MESTRADO, intitulada "EFEITO DO TRATAMENTO ANTI-HIPERTENSIVO COM LERCANIDIPINA NO REPARO E DENSIDADE ÓSSEA EM TÍBIAS DE RATOS" em sessão pública realizada em 23 de Fevereiro de 2011, considerou o candidato Isaac Vasconcelos de Araújo aprovado.

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

1. Profa. Dra. Marta Ferreira Bastos (UnG) 

2. Prof. Dr. Marcelo Rocha Marques (UNICAMP) 

3. Profa. Dra. Luciene Cristina de Figueiredo (UnG) 

Guarulhos, 23 de Fevereiro de 2011.

Dedico esta dissertação de mestrado e este momento de felicidade e realização aos meus pais, Hidelmar e Rosa Lídia, que me proporcionaram tudo, dentro do possível, para me tornar um cidadão digno e honrar princípios básicos como humildade e respeito ao próximo.

Às minhas irmãs Áurea Neudélia e Lorena Rosa que sempre sabem tornar o ambiente de nossas vidas mais engraçado e alegre.

Aos meus avôs Manoel (vovô Nezinho – *in memoriam*) e Maria Neudélia (vovó Neuza – *in memoriam*), pelo exemplo de vida deixado para nossa família.

À minha esposa Lidianne por estar ao meu lado e, junto com meus pais e irmãs, fazer com que eu acorde todas as manhãs disposto a fazer de cada dia um melhor que o outro.

## AGRADECIMENTOS

A Deus pela oportunidade de viver, pela saúde, pela paz e pela família que me deste, bases para alcançar meus anseios.

Aos meus pais Hidelmar e Rosa Lúcia pelo amor, pelo zelo, pelos ensinamentos, pelas boas influências e por continuarem ao meu lado, me orientando e aconselhando.

Aos meus avôs Manoel (*in memoriam*) e Maria Neudélia (*in memoriam*) por terem sido os regentes dos princípios e caráter que tento seguir.

Às minhas irmãs Áurea e Lorena por todos os anos de alegria que vivemos e continuamos vivendo, e pela força nos momentos de dificuldade.

À minha esposa Lidianne pelo amor, pelo companheirismo, pela dedicação ao nosso relacionamento e à família que formamos.

Aos amigos piauienses e demais familiares pelo incentivo na continuidade deste projeto.

Aos pacientes (clientes) pela compreensão durante as ausências e por abraçarem esta causa.

A toda a equipe que compõe a Clínica Hidelmar Carvalho: Dr. Hidelmar, Dra. Áurea e a todas as recepcionistas, as atendentes, à equipe de laboratório e auxiliar geral, que juntos permitiram as minhas ausências, muito obrigado, sem vocês isso não seria possível.

À Universidade Federal do Piauí – UFPI e a todos que compõem o Curso de Odontologia da UFPI por terem passado as primeiras impressões positivas sobre a vida acadêmica.

A todos que compõem a ABO – Seção Piauí, em especial às equipes de Endodontia, de Periodontia, de Prótese e de Implantodontia a quem cito Dr. Júlio Medeiros, Prof. Ms. Roberto Ferrari e Dr. Gerardo Aguiar, pelo incentivo e pelo apoio.

A Universidade Guarulhos (UNG), na pessoa da Profa. Dra. Magda Feres, por ter me aceito como pós-graduando e me permitido concluir esta fase acadêmica.

A todos os professores que compõem o corpo docente da Pós-Graduação em Odontologia da UNG em especial a Profa. Dra. Marta F. Bastos, orientadora, e a Profa. Dra. Poliana M. Duarte, co-orientadora, pela dedicação à pesquisa e à docência.

Aos amigos de turma Dra. Luciana, Dra. Tatiana, Dr. Antônio e Dr. Lucas e a todos os demais pós-graduandos, dentre os quais os conterrâneos Dra. Joyce, Dra. Stella e Dr. Eduardo pela amizade e pelo incentivo.

Aos alunos e funcionários das Clínicas de Odontologia e dos Laboratórios de Pesquisa da UNG pela amizade e pela ajuda durante o mestrado.

*Assim como a semente traça a forma e o destino da árvore, os teus  
próprios desejos é que te configuram a vida.*

*(Emmanuel – por Allan Kardec)*

## RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do tratamento com o anti-hipertensivo lercanidipina sobre o reparo ósseo e a densidade óssea em tíbia de ratos espontaneamente hipertensos (SHR), por meio de análise histométrica e histoquímica. Ratos pertencentes a linhagens Wistar e ratos SHR foram distribuídos nos seguintes grupos: normotensos (NTR) (n = 15); SHR não tratados (n = 15) e SHR tratados com lercanidipina (n = 15). O último grupo foi tratado diariamente com lercanidipina (2,5 mg/kg/dia) durante 6 semanas. Duas semanas após o início da administração da droga, um defeito cirúrgico de 3 mm de diâmetro por 3 mm de profundidade foi criado na tíbia direita de todos os grupos, enquanto a tíbia contralateral permaneceu sem defeito. Os animais foram sacrificados 30 dias após a criação do defeito ósseo, o que correspondeu a 45 dias do início da administração do fármaco ou do placebo, as tíbias foram removidas, fixadas, descalcificadas, desidratadas, diafanizadas e incluídas em parafina. Foram obtidas secções histológicas de 4 µm que foram submetidas a coloração com hematoxilina e eosina para avaliação da área de osso cortical recém-formado no defeito, a densidade óssea medular e cortical das tíbias sem defeito. Tíbias com e sem defeito também foram submetidas a procedimento histoquímico para evidenciar células expressando a fosfatase ácida tartarato-resistente (TRAP). Os resultados obtidos demonstram que não houve diferença significativa entre os grupos para o reparo ósseo, para densidade óssea na região medular e para o número de células positivas para TRAP nas tíbias com defeito ( $p > 0,05$ ). Porém, foi demonstrada uma maior densidade óssea cortical e menor número de células TRAP no grupo NTR e SHR tratados com lercanidipina, quando comparada ao grupo SHR não tratados ( $p < 0,05$ ). O presente estudo sugere que o tratamento de ratos SHR com lercanidipina durante 6 semanas, foi capaz de reverter os efeitos deletérios da hipertensão sobre a densidade óssea cortical e diminuir a expressão de células positivas para TRAP.

**Palavras-chave:** Lercanidipina, hipertensão, tecido ósseo, SHR, TRAP.



## ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effects of the treatment of spontaneously-hypertensive rats (SHR) with lercanidipine on bone healing and bone density of the tibia, using histometric and TRAP expression analyses. Wistar and SHR rats were assigned to one of the following groups: Normotensive rats (NTR) (n=15); Untreated (n=15) and Lercanidipine-treated SHR (n=15). The latter group was treated daily with lercanidipine for 6 weeks. Two weeks after the beginning of drug administration, a critical-size surgical defect was created in the right tibia of all groups while the contralateral tibia remained without defect. The animals were sacrificed thirty days after the creation of a bone defect, corresponding to 45 days after the beginning of drug/placebo administration. The area of newly-formed cortical bone in the defect (bone healing – BH), the medullar and cortical bone density (BD) of the tibia without defect and number of positive cells for tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) for both tibia were evaluated. There were no significant differences among groups for BH, medullar BD and number of TRAP+ cells in the defect ( $p>0.05$ ). Significant higher cortical BDs and lower number of TRAP+ cells were observed for NTR and lercanidipine-treated SHR, when compared to untreated SHR ( $p<0.05$ ). Treatment of SHR by lercanidipine during 6 weeks was able to increase the cortical BD and decrease the expression of TRAP+ cells.

**Key Words:** Lercanidipine, hypertension, bone tissue, SHR, TRAP.

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>8</b>
1.1. Hipertensão	8
1.2. Aspectos celulares e moleculares envolvidos no reparo ósseo	11
1.3. Efeitos da hipertensão no tecido ósseo	14
1.4. Tratamento anti-hipertensivo e tecido ósseo	16
1.5. Justificativa	17
<b>2. PROPOSIÇÃO</b>	<b>18</b>
<b>3. ARTIGO CIENTÍFICO</b>	<b>19</b>
<b>4. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>40</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>42</b>

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Hipertensão

Hipertensão ou pressão sanguínea arterial elevada é um problema de saúde pública, que afeta 25% da população adulta em países industrializados (Burt et al., 1995). Esta desordem é uma das principais causas de acidentes vasculares, infartos, paradas cardíacas e insuficiência renal (Mosterd et al., 1999; USRDS, 1999; Kannel, 2000).

O nível da pressão sanguínea depende da força de contração cardíaca (a quantidade de sangue bombeada pelo coração) e da resistência ao fluxo sanguíneo fornecida pelos vasos. Uma interrupção rápida de aporte sanguíneo causaria perda de consciência e, uma longa poderia resultar na morte do tecido que não recebeu irrigação apropriada. Ao contrário, o aumento da pressão fornece um fluxo elevado aos tecidos o que pode causar danos aos vasos sanguíneos (Lifton et al., 2001).

A pressão arterial pode ser considerada normal quando a pressão máxima (sistólica) for igual ou inferior a 130 mmHg e, a pressão mínima (diastólica) for igual ou inferior a 85 mmHg. Portanto, o estado hipertensivo pode ser caracterizado quando os valores da pressão sistólica forem iguais ou superiores a 140 mmHg, e os da diastólica forem iguais ou superiores a 90 mmHg (Bakris et al., 2008). Os valores da pressão diastólica são os mais importantes para a determinação da hipertensão devido ao fato da pressão sistólica ser normalmente alterada por variações emocionais e atividade física, enquanto a diastólica estar relacionada ao estado hipertensivo (Reaven, 2006).

Guyton et al. (1991) sugerem que alterações renais estariam relacionadas a patogênese da hipertensão, entre estas, defeitos na metabolização de sódio e a conseqüente alteração dos fluídos corporais. Uma segunda hipótese é de que a hipertensão poderia ser causada por alterações genéticas que afetariam a reabsorção de água e sal pelo néfron distal (Lifton et al., 2001). Outros estudos sugerem que alterações no endotélio poderiam interferir na resistência dos vasos e desta forma levar a um aumento da pressão sanguínea independente de alterações nas funções renais (Huang et al., 1995; Brenner et al., 2000; Zhu et al., 2002; Tang et al., 2003).

A pressão sanguínea pode ser controlada por uma série de mecanismos, dentre eles, o controle pelo reflexo barceptor, que é constituído por terminações nervosas localizadas na parede das grandes artérias e que respondem as alterações de calibre do vaso

sanguíneo (Brown et al., 1976; Brown, 1980). Os sinais emitidos pelos barorreceptores atingem principalmente a região do bulbo, e sinais secundários também são emitidos no intuito de excitarem o centro vagal, com conseqüente efeito de vasodilatação por todo o sistema circulatório periférico, diminuição da frequência cardíaca e da força de contração do coração. Estes efeitos desencadeiam uma redução da resistência periférica, do débito cardíaco e da pressão arterial (Andresen et al., 1978). Contudo, o mecanismo de regulação da pressão arterial pelo reflexo baroreceptor é mais eficaz na resposta a pressão que sofre rápida alteração, do que em resposta a uma pressão estacionária. Portanto, este mecanismo possui pouca importância na regulação da pressão arterial em longo prazo (Guyton et al., 1969).

A regulação prolongada da pressão arterial envolve outros sistemas de controle, sendo o principal o sistema de controle realizado pelos rins juntamente com os mecanismos hormonais associados (Silveira et al., 2008).

O sistema renina-angiotensina é considerado o principal mecanismo na regulação da pressão arterial. Este sistema é composto por diferentes mediadores como angiotensinogênio (Ang), angiotensina I (Ang I) e II (Ang II), enzima conversora de angiotensina (ECA), renina e pró-renina (Lonn et al., 1994). A pró-renina é produzida pelas adrenais, retina, ovários e testículos e é considerado o pré-hormônio inativo da renina (Batenburg et al., 2007). A conversão da pró-renina em renina (forma ativa), pode ser realizada de forma irreversível ou reversível. A forma irreversível ocorre nas células justaglomerulares do rim e pode ser realizada por vários tipos de enzimas como: proconvertase I, catepsina B, tripsina, plasmina e calicreína. Estas enzimas realizam a quebra proteolítica dos 43 aminoácidos da porção N-terminal da pró-renina convertendo-a em renina ao liberar o sítio ativo da enzima durante a quebra (Reudelhuber et al., 1994). A forma reversível de ativação da renina ocorre em sítios não-renais em condições de baixo pH e hipotermia que propiciam a quebra dos 43 aminoácidos que recobrem o sítio ativo, promovendo a ativação da renina (Reudelhuber et al., 1994; Ménard et al., 2006).

A renina ativa é uma enzima composta por 340 aminoácidos e pertencente à classe da família das aspartil-proteases, apresentando como resíduo crítico para atividade enzimática dois ácidos aspárticos: um na posição 32 e outro na de 215 (Asp32 e Asp 215) (James e Sielecki, 1985). A mesma é responsável pela conversão do Ang em Ang I. O Ang é uma proteína composta por 110 aminoácidos, produzido principalmente no fígado. Sete aminoácidos desta molécula se acomodaram no sítio catalítico da renina, de forma que a ligação peptídica entre a Leucina (décimo aminoácido) e a Valina (décimo primeiro

aminoácido) será hidrolisada liberando um decapeptídeo denominado Ang I. A Ang I liberada servirá como substrato para a ECA, que é encontrada no endotélio dos vasos pulmonares e atua na conversão da Ang I em angiotensina II (Ang II) (Verdecchia et al., 2008).

A Ang II é um vasoconstritor extremamente poderoso e exerce outros efeitos que afetam a circulação. Este metabólito pode atuar de duas maneiras na elevação da pressão arterial. A primeira ocorre de maneira rápida para induzir a vasoconstrição que ocasiona a constrição de veias e arteríolas, que leva a um aumento da resistência periférica e promove a elevação da pressão arterial. A Ang II também promove a diminuição da excreção de sal e água pelos rins, o que leva a um aumento lento do volume do líquido extracelular, que conseqüentemente eleva a pressão arterial (Mehta e Griendling, 2007).

A Ang II exerce vários efeitos intra-renais que culminam na retenção de sal e água pelos rins. Um dos mecanismos mais importantes consiste na constrição de vasos sanguíneos renais, levando a uma diminuição do fluxo sanguíneo pelos rins e desta forma uma menor quantidade de líquido é filtrada pelos glomérulos. Outro fator que influencia o menor volume de urina excretado é o fato de, quando dentro dos capilares peritubulares, o fluxo sanguíneo é lento, a pressão é reduzida e isso permite uma maior reabsorção osmótica de líquido a partir dos túbulos. Além disso, a Ang II exerce efeito moderado sobre as células tubulares, levando a uma maior reabsorção tubular de sódio e água. O resultado total destes efeitos é significativo na diminuição de até quatro a seis vezes do débito urinário normal (Mehta e Griendling, 2007).

Por outro lado, a Ang II estimula a secreção de aldosterona pelas glândulas supra-renais, e esta por sua vez aumenta a absorção de sal e água pelos túbulos renais. A aldosterona desempenha um papel importante na regulação de eletrólitos e equilíbrio hídrico (Jennings et al., 2005; Connell e Davies, 2005). A maioria dos efeitos induzidos pela aldosterona ocorre após sua ligação ao mineralocorticóide intracelular. A formação do complexo aldosterona-mineralocorticóide o transloca para o núcleo, onde irá modular a transcrição e a tradução da proteína “induzida por aldosterona” envolvida na homeostasia da pressão arterial (Bunda et al., 2009). A aldosterona atuará principalmente no túbulo contornado distal do néfron fazendo com que ocorra uma maior reabsorção de sal e água. Isso acaba provocando um aumento no volume sanguíneo e, conseqüentemente um aumento no débito cardíaco e na pressão arterial (Rocha e Funder, 2002).

## **1.2. Aspectos celulares e moleculares envolvidos no reparo ósseo.**

O osso é uma estrutura complexa e organizada, mantida por meio de um dinâmico processo de remodelação, coordenado por células osteoblásticas e osteoclasticas que têm a responsabilidade de reabsorver e reparar o tecido ósseo, mantendo a integridade e a fisiologia normal (Wright et al., 2009; Raggatt e Partridge, 2010).

O reparo ósseo restabelece originalmente as propriedades mecânicas e físicas do osso, e é influenciada por uma variedade de fatores sistêmicos e locais. O reparo ocorre em três estágios distintos, mas que se superpõem: o primeiro, estágio inflamatório; o segundo, estágio de reparo; e o estágio de remodelação, tardio (DePalma et al., 1972; Buchardt e Enneking, 1978).

No estágio inflamatório, desenvolve-se um coágulo no sítio da lesão durante as primeiras horas e dias, com a presença de células inflamatórias (macrófagos, monócitos, linfócitos e células polimorfonucleares) e de um infiltrado fibroblástico mediado pela produção de prostaglandinas. Isto resulta na formação do tecido de granulação, desenvolvimento do tecido vascular e migração de células mesenquimais. O uso de medicação antiinflamatória ou citotóxica durante a primeira semana altera a resposta inflamatória e inibe a cicatrização óssea (Kalfas, 2001). Durante o segundo estágio de reparo, fibroblastos começam a migrar em direção à lesão, dando suporte ao crescimento vascular. Este processo de proliferação vascular, em direção ao centro da matriz de colágeno promove a formação de osteóides que em seguida serão mineralizados (Rubenstein et al., 1991; Daftari et al., 1994). O processo de reparo é completado durante o estágio de remodelamento no qual a remodelação óssea restaura a forma, estrutura e resistência mecânica original. O remodelamento do osso ocorre lentamente durante meses e até anos e é incrementado nos lugares onde ocorre estresse mecânico (Riebel et al., 1995; Silcox, 1995).

A base para o processo normal de remodelação óssea envolve a atividade de formação óssea realizada pelos osteoblastos e de reabsorção desenvolvida pelos osteoclastos. Em condições fisiológicas essas duas atividades agem simultaneamente, ou seja, a quantidade de osso formada pelos osteoblastos é a mesma reabsorvida pelos osteoclastos. Por sua vez, em condições patológicas podem ocorrer um desequilíbrio gerando tanto a perda de massa óssea por uma produção ineficiente pelos osteoblastos ou por excesso de reabsorção pelos osteoclastos (Lerner, 2006). No entanto, a causa mais comum de desequilíbrio no processo de remodelamento ósseo é o aumento da atividade de

osteoclastos, que leva ao aumento da reabsorção e conseqüentemente à diminuição da densidade óssea (Wright et al., 2009).

Além disso, tem sido proposto que a morte ou a apoptose de osteócitos coincide com a reabsorção óssea por parte dos osteoclastos, o que seria o início do processo de remodelação óssea (Noble et al., 1997; Verborgt et al., 2000). Outro estudo, de Hazenberg et al., em 2006, sugere que a ruptura celular de osteócitos, devido a microfissuras, pode contribuir para regulação do processo de remodelação óssea.

Estudos moleculares têm levado a uma melhor compreensão dos mecanismos e proteínas envolvidas na reabsorção óssea. Atualmente, sabe-se que este processo é controlado por um sistema composto principalmente por três proteínas: RANK [receptor do ativador do fator nuclear kappa beta (NF- $\kappa$ B)], seu ligante RANKL (ligante do receptor do ativador do NF- $\kappa$ B) e o “competidor natural” por RANKL chamado de OPG (osteoprotegerina) (Leibbrandt et al., 2008). Este sistema é regulado por alguns hormônios e citocinas os quais reduzem [glicocorticóides, citocinas inflamatórias interleucina (IL)-1, paratormônio, prostaglandina E2, vitamina D3] ou aumentam [fator de crescimento transformador (TGF)-  $\beta$  e estrógeno] a razão OPG / RANKL (Wright et al., 2009).

RANK é uma glicoproteína transmembrana composta por 616 aminoácidos e membro da família de receptores do TNF- $\alpha$  (fator de necrose tumoral) (Anderson et al., 1997; Hofbauer e Heufelder, 2001). A expressão do RANK ocorre em diversas células tais como: precursores de osteoclastos, osteoclastos, monócitos circulantes e células dendríticas (Wright et al., 2009).

RANKL é uma citocina semelhante ao TNF- $\alpha$  e pode ser expressa por vários tipos celulares como osteoblastos e seus precursores, linfócitos T, linfócitos B, megacariócitos e, também pode ser encontrado na sua forma solúvel (sRANKL). A expressão de RANKL pode ser estimulada por citocinas (IL-1 e TNF $\alpha$ , IL-11), paratormônio (PTH), 1,25dihidroxitamina D<sub>3</sub> (1,25D<sub>3</sub>) e prostaglandina E2 (Hofbauer e Heufelder, 2001; O'Brien, 2001). Um aumento na produção de RANKL por células osteoblásticas leva a diferenciação, ativação e aumento do tempo de sobrevivência de osteoclastos, e conseqüentemente ao aumento da reabsorção óssea (Ikeda et al., 2001).

OPG assim como RANK pertence a família dos receptores de TNF e foi nomeado de acordo com o efeito protetor que apresenta sobre o tecido ósseo (em latim *os*: significa osso e *protegere*: significa proteção). OPG é uma glicoproteína solúvel secretada por várias células mesenquimais tais como osteoblastos e células da medula óssea

(Simonet et al., 1997). O OPG atua como um competidor de alta afinidade pela ligação com o RANKL, e desta forma previne a interação do RANKL com o RANK. Conseqüentemente, a ligação do OPG ao RANKL atua como um inibidor efetivo da diferenciação e ativação de osteoclastos e assim inibe a reabsorção óssea (Kong et al., 2000). Sua produção pode ser modulada por diferentes mediadores, tais como: IL- 1, TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$  que promovem o aumento da secreção de OPG e, a diminuição da síntese da mesma pode ocorrer pela ação de estimulantes da reabsorção óssea tais como PTH, PGE<sub>2</sub> e 1,25D<sub>3</sub> (Hofbauer e Schoppet, 2004).

A interação de RANKL com o RANK presente na superfície de células precursoras de osteoclastos atua como principal mecanismo molecular pelo qual é desencadeado o processo de reabsorção óssea. Esta ligação ativa uma cascata de sinalização intracelular que resulta na ativação do NF- $\kappa$ B. O NF- $\kappa$ B é um fator de transcrição que promove a expressão de vários genes responsáveis pela diferenciação de pré-osteoclastos em osteoclastos e também na ativação de osteoclastos maduros (Soysa e Alles, 2009). Desta maneira, o NF- $\kappa$ B regula a formação, função e sobrevivência de osteoclastos e a síntese de vários mediadores, entre estes, a fosfatase ácida tartarato-resistente (TRAP) (Wada et al., 2006)

O TRAP é uma enzima específica na marcação de osteoclastos que faz parte da família das fosfatases ácidas e apresenta localização intracelular, mais especificamente dentro do compartimento lisossomal de osteoclastos, macrófagos e células dendríticas. Alguns estudos também demonstraram que esta enzima pode ser secretada, no caso do tecido ósseo, a enzima ficaria localizada entre a membrana celular do osteoclasto e a matriz óssea (Habermann et al., 2007). O TRAP possui importante participação em processos biológicos que incluem o desenvolvimento do esqueleto porque apresenta efeito negativo sobre atividade de osteoblastos e é essencial para atividade de reabsorção desempenhada pelos osteoclastos. Roberts et al. (2007) demonstraram que TRAP tem função fundamental no processo de síntese e processamento de colágeno tipo I, um dos principais componentes de matriz óssea e também apresenta efeito sobre a mineralização do tecido ósseo por degradar osteopontina (Haymam, 2008). Devido a todas estas atividades sobre tecido ósseo, a análise da expressão de TRAP tem sido utilizada como um marcador histoquímico para atividade osteoclástica (Habermann et al., 2007).

O potencial de reparo e densidade do tecido ósseo é influenciado por fatores biomecânicos, hormonais e patológicos que podem influenciar no risco de fraturas, na fragilidade do esqueleto e na neoformação óssea necessária para reabilitação do processo



alveolar após extração dentária, em casos de fraturas e de implantes dentais ou ortopédicos (Kalfas, 2001).

### **1.3. Efeitos da hipertensão no tecido ósseo.**

Diversos estudos clínicos e experimentais tem relacionado a hipertensão, com a diminuição da densidade óssea (Barbagallo et al., 1990; Cappuccio et al., 1999; Tsuda et al., 2001; Vestergard et al., 2009; Bastos et al., 2010a). Além disto, Bastos et al., (2010b), demonstraram que o aumento da pressão sanguínea apresenta efeito negativo sobre os estágios iniciais do reparo ósseo em ratos espontaneamente hipertensos (SHR).

Estudos clínicos que avaliaram o efeito da hipertensão sobre os tecidos ósseos apresentaram resultados controversos. Alguns estudos relataram que a hipertensão poderia afetar o tecido ósseo por promover o aumento dos níveis séricos de cálcio, por meio da perda mineral óssea sugerindo uma associação negativa entre pressão sanguínea e densidade mineral óssea (McCarron, 1982; MacGregor e Cappuccio, 1993). Mais recentemente, Vestergaard et al. (2009) relataram uma associação direta da hipertensão arterial com um risco aumentado a fraturas ósseas e, Shimizu et al. (2008) demonstraram uma associação entre elevação da pressão sanguínea com aumento na perda óssea, especialmente em mulheres idosas. Entretanto, Larijani et al. (2004) não conseguiram demonstrar associação entre aumento da pressão sanguínea e alteração na densidade óssea do fêmur em indivíduos do sexo masculino. Os autores sugeriram que outros estudos devem ser realizados para compreender as relações existentes entre densidade óssea e hipertensão em humanos.

Buscando-se respostas para a interação entre hipertensão e metabolismo ósseo os ratos espontaneamente hipertensos (SHR) têm sido utilizados e os resultados destes estudos tem-se mostrado menos controversos que os estudos clínicos (Bastos et al., 2010a).

Wang et al. (1993) demonstraram uma queda na concentração de cálcio e na absorção intestinal do cálcio levando ao aumento de cálcio na urina de ratos SHR. Além disto, estes animais apresentaram uma menor taxa de crescimento longitudinal, menor volume ósseo acompanhado por uma pobre arquitetura trabecular. Também foi observado um aumento significativo no número de osteoclastos e na proporção osteoclastos/osteoblastos.

Inoue et al. (1995), avaliaram o crescimento ósseo de ratos SHR e Sprague-Dawley (SD) e os resultados mostraram que os SHR de ambos os sexos apresentavam

menor densidade óssea mineral que os SD. Os autores sugeriram que o osso trabecular dos ratos SHR apresentaram um menor conteúdo mineral que os ratos SD e, que esta alteração pode acontecer devido a um anormal processo de mineralização.

A avaliação histométrica de tíbias de animais SHR do sexo feminino submetidos ao processo de ovariectomia demonstrou que estes animais apresentavam uma diminuição da densidade óssea quando comparados aos normotensos (Liang et al., 1997).

Outro estudo avaliou a influência da hipertensão sobre a densidade óssea mineral e demonstrou que o conteúdo mineral (cálcio, magnésio e fósforo) é menor em ratos SHR quando comparados aos ratos normotensos da linhagem Wistar. Os autores também demonstraram que o aumento de cálcio na dieta protege o osso contra o potencial deletério (Metz et al., 1990). Wright e DeMoss (2000), após comparar ratos machos e fêmeas hipertensos com machos e fêmeas normotensos por meio do modelo de 3H-tetraciclina, demonstraram que os animais hipertensos apresentaram maior reabsorção óssea quando comparado aos ratos normotensos. Pereira et al., em 2007, demonstraram uma redução da densidade óssea mineral (BMD) em SHR, quando comparado a controles com pressão arterial normal. Mais recentemente, Bastos et al., (2010b) observaram uma menor densidade óssea, um aumento da expressão de células TRAP+ e aumento de RANKL/OPG no tecido ósseo alveolar de animais SHR.

Apenas um estudo *in vitro* tentou esclarecer a relação entre hipertensão e osteoporose, avaliando o papel da Ang II sobre o metabolismo ósseo. Foi observado que a Ang II induz a expressão de RANKL, o que leva a ativação de osteoclastos e a reabsorção óssea. Os autores sugeriram que drogas que bloqueiam a atividade da Ang II podem tornar-se uma boa estratégia terapêutica na prevenção da osteoporose em pacientes hipertensos (Shimizu et al., 2008).

Embora diversos estudos tenham demonstrado uma influência negativa da hipertensão sobre tecidos ósseos, poucos estudos focaram o efeito desta patologia sobre o reparo ósseo. Pereira et al. (2007), observaram uma maior neoformação óssea nos ratos hipertensos quando comparada aos normotensos, 21 dias após a confecção dos defeitos. Enquanto, Bastos et al. (2010a) observaram que SHR apresentavam uma menor área de osso neoformado quando comparado aos normotensos, 8 dias após a confecção do defeito.

#### 1.4. Tratamento anti-hipertensivo e tecido ósseo

Após vários estudos terem sugerido que o aumento da pressão sanguínea está associado com anormalidades no metabolismo do cálcio, outros estudos têm sido realizados na tentativa de buscar drogas anti-hipertensivas que apresentem efeitos benéficos também sobre o metabolismo ósseo. Diferentes drogas têm sido utilizadas para o tratamento da hipertensão e podem ser classificadas em: bloqueadores dos canais de cálcio, inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA), antagonistas dos receptores tipo 1 de angiotensina II (AT1) e diuréticos (Nishiya e Sugimoto, 2001; Borghi, 2005). Ambos, os inibidores da ECA e antagonistas AT1 interferem com o sistema renina-angiotensina no controle da pressão arterial (Fleckenstein, 1984; Katz et al., 1984).

Ma et al. (1997) demonstraram que o tratamento com anti-hipertensivo moexipril, inibidor da enzima conversora de angiotensina (ECA) associado a hidroclorotiazida, um diurético pertencente ao grupo das tiazidas, apresentou um efeito na redução da pressão arterial, e interessantemente demonstrou um efeito protetor para o tecido ósseo de SHR osteopênicos. Porém, a administração de outro medicamento também pertencente à categoria de inibidor da ECA, o enalapril e o losartan, um antagonista do receptor AT1 não causaram mudanças significativas na densidade óssea (Broulik et al., 2001).

Os bloqueadores dos canais de cálcio inibem, principalmente, o influxo de cálcio através dos canais de cálcio tipo L na musculatura lisa dos vasos, e desta forma interrompem o processo de contração da parede vascular (Allhat Officers and Coordinators, 2002). As dihidropiridinas (DHPs) são um grupo de drogas do tipo antagonista de receptores de cálcio, assim como a fenilalquilamina, a verapamil, o benzodiazepino, e a diltiazem. No entanto, as DHPs têm sido escolhidas para tratamento da hipertensão por produzirem efeitos diuréticos similares aos  $\beta$ -bloqueadores, e inibidores de ECA em relação a prevenção da mortalidade por doenças cardiovasculares e, por reduzirem as taxas de infarto em pacientes idosos com hipertensão (Allhat Officers and Coordinators, 2002).

As DHPs atuam primariamente como vasodilatadores, porém alguns medicamentos como a felodipina produzem efeitos indesejados, como a taquicardia. Por isso, ao longo dos anos, modificações foram feitas na tentativa de se prolongar o tempo de duração do efeito anti-hipertensivo destes medicamentos e diminuir suas reações adversas.

(Hardy et al., 1988; Bainbridge et al., 1991; Binggeli et al., 2002; Massicotte et al., 2003; Wirtz e Herzig, 2004).

Com base na observação de que os canais de  $Ca^{2+}$  tipo L também estão presentes nas células ósseas, alguns estudos avaliaram efeito das DHPs sobre o tecido ósseo, porém resultados contraditórios têm sido demonstrados (Ritchie et al., 1994; Kosaka e Uchii, 1998; Nishiya e Sugimoto, 2001; Halici et al., 2008; Ushijima et al., 2010).

Efeitos benéficos do tratamento foram observados em estudos *in vitro* que demonstraram que benidipina, mas não a amlodipina e a nifedipina, foi capaz de regular a diferenciação, proliferação e função de osteoblastos, assim como promover a deposição mineral (Kosaka e Uchii, 1998; Nishiya e Sugimoto, 2001). Estudos experimentais demonstraram efeito benéfico da amlodipina, pertencente a segunda geração de DHPs, sobre o metabolismo ósseo (Halici et al., 2008; Ushijima et al., 2010), enquanto estudo prévio relatou efeito deletério desta droga sobre o reparo do osso alveolar após extração do elemento dental (Teófilo et al., 2001).

A lercanidipina é uma droga pertencente à última geração das DHPs, que apresenta meia-vida prolongada e alta capacidade de sustentar a vasodilatação sem ativação simpatomimética, o que promove a diminuição do edema periférico e dos eventos cardiovasculares (Wirtz e Herzig, 2004; Borghi, 2005; Makarounas-Kirchmann et al., 2009).

A eficácia e tolerabilidade da lercanidipina a tornam uma escolha adequada para o tratamento da hipertensão para uma ampla gama de pacientes (Borghi, 2005). Apenas um estudo avaliou o efeito da lercanidipina sobre o tecido ósseo em SHR, no qual os autores demonstraram um efeito benéfico deste medicamento sobre o metabolismo ósseo exemplificado pela diminuição do número de células expressando TRAP e uma menor proporção do RANKL / OPG (Bastos et al., 2010b).

### **1.5. Justificativa**

Com base no fato de que a hipertensão é uma das desordens sistêmicas mais prevalentes no mundo, associado ao efeito deletério desta patologia sobre o tecido ósseo, além da escassez de estudos que avaliem o reparo ósseo no estado hipertensivo tratado ou não, torna-se importante a realização de estudos que avaliem o efeito do tratamento anti-hipertensivo sobre o reparo ósseo e a densidade óssea.

## **2. PROPOSIÇÃO**

O presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos do tratamento com lercanidipina sobre o reparo ósseo e a densidade óssea em tíbia de ratos espontaneamente hipertensos, por meio de análise histométrica e histoquímica da expressão de TRAP.

### **3. ARTIGO CIENTÍFICO**

Submetido ao *European Journal of Farmacology*

## **EFFECTS OF LERCANIDIPINE ON BONE DENSITY AND BONE REPAIR IN SPONTANEOUSLY-HYPERTENSIVE RATS**

**A manuscript number has been assigned to EFFECTS OF LERCANIDIPINE ON BONE DENSITY AND BONE REPAIR IN SPONTANEOUSLY-HYPERTENSIVE RATS**

ees.ejp.0.ea118.96d19437@eesmail.elsevier.com em nome de The European Journal of Pharmacology [ejp-office@pharm.uu.nl]

**Enviado:** quinta-feira, 20 de janeiro de 2011 6:49

**Para:** Marta Bastos

Dear Dr Bastos,

Your submission entitled "EFFECTS OF LERCANIDIPINE ON BONE DENSITY AND BONE REPAIR IN SPONTANEOUSLY-HYPERTENSIVE RATS" has been assigned the following manuscript number: EJP-33885.

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Elsevier Editorial as an author.

The URL is <http://ees.elsevier.com/ejp/>.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

EJP Editorial Office  
Editorial Office  
European Journal of Pharmacology

For further assistance, please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.

## **ABSTRACT**

The aim of this study was to evaluate the effects of the lercanidipine on bone healing and bone density in the tibia of spontaneously-hypertensive rats (SHR), using histometric and tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) expression analyses. Wistar and SHR rats were assigned to one of the following groups; normotensive rats (NTR) (n=15); untreated SHR (n=15) and lercanidipine-treated SHR (n=15). The latter group was treated daily with lercanidipine for 6 weeks. Two weeks after the beginning of drug administration, a critical-sized surgical defect was created in the right tibia of all groups, while the contralateral tibia remained without defect. The animals were sacrificed thirty days after the creation of the bone defect. The area of newly-formed cortical bone in the defect (bone healing – BH), the medullar and cortical bone densities (BD) of the tibia without defect and number of positive cells for TRAP for both tibia were evaluated. There were no significant differences among groups for BH, medullar BD and for number of TRAP+ cells in the newly-formed cortical bone ( $p>0.05$ ). Significantly higher cortical BDs and lower numbers of TRAP+ cells were observed for NTR and lercanidipine-treated SHR, when compared to untreated SHR ( $p<0.05$ ). In conclusion, the treatment of SHR with lercanidipine for 6 weeks was able to increase the cortical BD and decrease the expression of TRAP+ cells in the tibia of SHR.

**Key Words:** Lercanidipine, hypertension, bone tissue, SHR, TRAP.



## 1. INTRODUCTION

Bone is well recognized as a complex structure maintained by a dynamic remodeling process that is coordinated by osteoclast and osteoblast cells, which are responsible for the removal and repair of tissue to maintain the integrity of the normal bone physiology (Wright et al., 2009; Raggatt and Partridge, 2010). The healing potential and the density of bone tissue are strictly influenced by various biomechanical, hormonal and pathological events that may affect the risk and repair of fractures, skeletal fragility, orthopedic and dental implants and bone formation after a dental extraction (Kalfas, 2001).

Hypertension, a highly prevalent chronic vascular disorder, has been linked to an increased loss rate of bone mineral density in clinical and experimental studies (Barbagallo et al., 1990; Cappuccio et al., 1999; Tsuda et al., 2001; Vestergaard et al., 2009; Bastos et al., 2010a). In addition, high blood pressure has been proposed to negatively influence the early stage of bone healing in spontaneously hypertensive rats (SHR), a well-recognized model of essential hypertension (Bastos et al., 2010a).

Among drugs currently available for the treatment of hypertension, calcium channel blockers present clear antihypertensive efficacy and benefits in preventing cardiovascular complications. Dihydropyridines are the most frequently-prescribed calcium channel blockers for hypertension. The third generation dihydropyridines, including lercanidipine, allow a long-acting antihypertensive profile and a reduced incidence of adverse effects such as peripheral edema and reflex tachycardia (Burnier et al., 2009). These drugs slow calcium influx via the L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel in cardiac system and smooth muscle cells, disrupting the contraction process. Since bone cells express these channels, it is suggested that dihydropyridine-type calcium antagonist signaling through the L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel could affect bone metabolism (Duncan et al., 1988). Thus, the impact of the dihydropyridines on bone tissue and cells has been assessed by some previous studies (Ritchie et

al., 1994; Kosaka and Uchii, 1998; Nishiya and Sugimoto, 2001; Halici et al., 2008; Ushijima et al., 2010); however, contradictory results have been reported. *In vitro* studies have suggested that benidipine, but not amlodipine and nifedipine, regulates the differentiation, proliferation and function of osteoblasts and promotes mineral deposition (Kosaka and Uchii, 1998; Nishiya and Sugimoto, 2001). In addition, while some experimental studies have demonstrated some beneficial effects of amlodipine, a second generation of dihydropyridines, on bone metabolism (Halici et al., 2008; Ushijima et al., 2010), a previous study showed deleterious effects of this drug on alveolar bone repair after tooth extraction (Teófilo et al., 2001). A recent study from our research group has demonstrated that SHR receiving lercanidipine present a decreased expression of bone resorption markers in the tooth-supporting alveolar bone, including an decreased receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand (RANKL) /osteoprotegerin ratio and altered tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) (Bastos et al., 2010b).

Considering the clinical relevance of bone healing and density in several medical and dentistry situations and the lack of studies focusing on the role of lercanidipine in bone repair, the aim of this study was to evaluate the effects of the lercanidipine on bone healing (BH) and bone density (BD) in the tibia of SHR, using histometric and TRAP expression analyses.

## **2. MATERIALS AND METHODS**

### *2.1. Animals*

Fifteen male normotensive Wistar rats (NTR) and thirty SHR were acquired from the University of Campinas (Campinas, São Paulo, Brazil). The animals were maintained during acclimatization (5 days) and experimental periods (45 days) in the Bioscience Laboratory of Guarulhos University with water and food (Labina, Purina®, Paulinia, SP,

Brazil) *ad libitum*, alternate periods of light/dark (12h) and a temperature of between 22°C and 24°C. Rats were 90 days of age and weighed approximately  $225 \pm 19$ g at the beginning of the study. The animals were housed in groups of five in plastic cages. The Institutional Committee for Animal Care and Use at Guarulhos University (Guarulhos, São Paulo, Brazil) previously approved this study protocol (P004/2008).

### 2.2. *Experimental design*

The animals were assigned to one of the following experimental groups: NTR, control (n=15); Untreated SHR (n=15) and Lercanidipine-treated SHR (n=15). The latter group was treated daily with lercanidipine (2.5 mg/kg body weight/day diluted in water, Medley®, Campinas, SP, Brazil) by gavage according to Sabbatini et al. (2000). The other groups received only water by gavage (placebo) during 6 weeks.

### 2.3. *Bone healing and density*

Two weeks after the beginning of the lercanidipine/placebo treatments, the animals were submitted to general anesthesia by intramuscular administration of xylazine (0.3 ml/kg, Virbaxil®; Virbac do Brasil Industria e Comércio LTDA, Roseira, SP, Brazil) and ketamine (0.5ml/Kg, Virbaxil®; Virbac do Brasil Industria e Comércio LTDA, Roseira, SP, Brazil). Subsequently, the skin was cleaned with iodine surgical soap and an incision of approximately 1 cm in length was made in the superior extremity of the right tibia in the direction of the femoral joint. A full thickness flap was then reflected and the bone surfaces of the tibiae were exposed. Under profuse saline solution irrigation, a unicortical circumferential critical-size defect (3.0 x 3.0 mm) was drilled on the metaphyseal area of the tibiae with a 3.0mm wide trephine bur at a rotary speed not exceeding 1,500rpm (Figure 1, page 35). The bur was introduced in the medular area to create a drill hole with 3mm of height. The soft tissues were then repositioned and sutured to achieve the primary closure [Silk 4.0 (Ethicon, São Paulo, SP, Brazil)]. The left tibia was left without any

defect for use in the analysis of bone density. Thirty days after the creation of the bone defect, corresponding to 6 weeks after the beginning of lercanidipine/placebo administration, the animals were sacrificed by CO<sub>2</sub> inhalation.

#### *2.4. Histological procedures*

Right and left tibia were removed and fixed in modified Karnovsky solution (2% paraformaldehyde, 0.5% glutaraldehyde and 0.2% picric acid) for 24 hours. Subsequently, the specimens were decalcified in a solution containing 4.3 % ethylene-diamine tetraacetic acid (EDTA) for 40 days, dehydrated in an ascending series of ethanol solutions and embedded in paraffin. Semi-serial histological sections (5 µm) were obtained in a longitudinal direction, starting from the central area of the defects. Similar sections were also obtained from the corresponding area of the tibia without any defect. Ten equally distant sections per tibia, 20 µm apart, were chosen for histometric evaluation and stained with hematoxylin and eosin solutions.

#### *2.5. Histometric analysis*

For the analysis of BH, the area (mm<sup>2</sup>) of newly-formed bone was delineated in the cortical region of the tibia, where the defect was created using image analysis software (Image-Pro®, Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA). For the analysis of the BD of the tibia without defect, two standardized quadrilateral areas were delimited in the cortical (0.1 mm<sup>2</sup>) and medullar (0.2 mm<sup>2</sup>) areas, separately. Subsequently, a checkered diagram with 240 intersections was overlaid in these previously-delimited regions. The number of intersections, under which the presence of bone tissue was observed, was then counted. The 240 intersections were considered as 100% and the cortical and medullar BDs were calculated, separately, according to the following formula: (number of counted intersections/240) x 100. Both analyses were performed by one trained (IA), calibrated and

blinded examiner using image analysis software (Image-Pro®, Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA).

#### *2.6. Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) staining*

TRAP staining was performed to identify and quantify bone-resorption associated cells. Two sections/tibiae of the central portion of the defect and two sections of the corresponding region of the tibia without defect were chosen for TRAP analysis. The sections were deparaffinized and incubated at 37°C for 15 min in a solution containing 4mg naphthol AS-BI, 24 mg red violet salt (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA), 30mL acetate buffer (pH 5.2, Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) and 0.3 mmol/L tartrate (pH 5, Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA). Subsequently, sections were washed in distilled water and counter-stained with hematoxylin. Consecutive sections were incubated in substrate-free medium as a negative control for TRAP activity. The number of TRAP+ cells was counted at x100 magnification in an 200 µm zone of the cortical bone for both tibia by one trained, calibrated and blinded examiner (TEDG), using image analysis software (Image-Pro®, Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA).

#### *2.7. Statistical analysis*

Statistical analyses were performed using statistical software (BioEstat 3.0, Sociedade Civil Mimirauá, Tefé, AM, Brazil). Data were first examined for normality by the Kolmogorov-Smirnov test and, since data demonstrated normality, analyses were performed using parametric methods. The area of newly-formed cortical bone (BH), the cortical and medullar BDs and the number of TRAP+ cells in cortical area of the tibia with and without defects were computed for each animal. ANOVA was used to demonstrate the significance of differences among groups. If significance was detected, the pair-wise multiple comparisons Tukey test was used to assess differences between groups. The significance level established for all analyses was 5% ( $p < 0.05$ ).

### 3. RESULTS

All animals gained weight during the study; however no statistically significant difference were observed among the mean body weights of the NTR and SHR groups ( $p=0.25$ ). The final mean body weight was  $405.3 \pm 35.2\text{g}$ ,  $398.6 \pm 41.5\text{g}$  and  $401.4 \pm 38.5\text{g}$  for the NTR, untreated SHR and lercanidipine-treated SHR groups, respectively.

#### 3.1. Histometric analysis

##### 3.1.1. Bone healing

There were no significant differences among groups for BH ( $p=0.55$ ). The means areas of newly-formed cortical bone for the NTR, untreated SHR, and lercanidipine-treated SHR groups were  $0.09 \pm 0.03 \text{ mm}^2$ ,  $0.10 \pm 0.02 \text{ mm}^2$  and  $0.10 \pm 0.05 \text{ mm}^2$ , respectively (Figure 2A, page 36). Fig. 2B-2D illustrate the histological findings of BH for all experimental groups (page 36).

##### 3.1.2. Bone density

Significantly higher cortical BDs were observed for NTR ( $91.0 \pm 2.2\%$ ) and lercanidipine-treated SHR ( $93.0 \pm 2.2\%$ ), when compared to untreated SHR ( $86.0 \pm 4.9\%$ ;  $p<0.05$  – Figure 3 A). On the other hand, there were no differences among groups for medullar BD ( $18.6 \pm 4.8\%$ ,  $20.2 \pm 5.1\%$ ,  $19.6 \pm 4.7\%$  for NTR, untreated SHR and lercanidipine-treated SHR, respectively - Figure 3 B, page 37). Figures 3C-3E illustrate the histological findings of the cortical and medullar areas of the tibia without defect (page 37).

#### 3.2. TRAP staining

The number of TRAP+ cells in the newly-formed cortical bone was similar in all groups (Figure 4A-D,  $p=0.56$ , page 38). However, NTR and lercanidipine-treated SHR demonstrated a lower number of TRAP+ cells in cortical bone, compared to untreated SHR in the tibiae without defect (Figure 5A-5D,  $p<0.05$ , page 39).

#### 4. DISCUSSION

Since bone cells contain L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels, the dihydropyridine compounds could play a role in bone metabolism, as well as an antihypertensive effect. However, the impact of these drugs especially that of a third generation drug such as lercanidipine, on bone tissue is still unclear. Therefore, this study evaluated, for the first time, the effect of lercanidipine on bone density and bone repair in the tibia of SHR. In general, results demonstrated that SHR presented lower cortical bone density and increased levels of TRAP+ cells and that lercanidipine was able to reestablish these harmful effects of hypertension in bone. In addition, the hypertensive status did not affect bone repair and, therefore, no effect of lercanidipine administration was also observed in SHR. These animals received 2.5 mg/Kg of lercanidipine daily, since this therapeutic protocol was previously demonstrated to efficiently control hypertension in SHR after two weeks (Sabbattini et al., 2000).

In this study, SHR presented a lower cortical bone density and a concomitant increase in the number of TRAP+ cells. These detrimental impacts of hypertension on bone density are supported by previous investigations that showed that SHR presented long bone disorders, including reduced cortical thickness, bone density and calcium content and increased resorptive activity (Izawa et al., 1985; Barbagallo et al., 1990; Wright and DeMoss, 2000; Tsuda et al., 2001; Bastos et al., 2010a). In addition, the present results are also in agreement with those of a previous study from our research group that demonstrated that bone density was lower and the number of TRAP+ cells was increased in the alveolar bone of SHR (Bastos et al., 2010b). TRAP is considered a histochemical marker of osteoclasts and, therefore, a critical indicator of bone resorption. It has a critical role in collagen synthesis and degradation and mineralization of bone and is also able to degrade skeletal phosphoproteins including osteopontin (Habermann et al., 2007, Hayman 2008). In support of our TRAP results, previous studies have demonstrated an increased

number of osteoclast cells in SHR, when compared to NTR (Merke et al., 1989; Wang et al., 1993). A potential explanation for the higher osteoclast quantity in bone tissues of SHR may be the fact that angiotensin II (Ang II), an important blood vessel constrictor that drives blood pressure up, increases osteoclast activation (Hatton et al. 1997, Hagiwara et al., 1998; Shimizu et al., 2008). Shimizu et al. (2008), for example, showed that Ang II directly induced RANKL expression in osteoblasts through the Ang II type 1 receptor, leading to osteoclast activation and increasing the number of TRAP+ cells.

The most original finding of this study is the observation that lercanidipine was able to revert the deleterious effects of hypertension on cortical bone density and on the number of TRAP+ cells in the tibia of SHR. A previous study evaluated the effects of lercanidipine on the alveolar bone of SHR. In agreement with the present study, the authors also demonstrated decreased TRAP+ expression in tooth-supporting alveolar bone in SHR under continuous administration of lercanidipine (Bastos et al., 2010b). Although the impact of lercanidipine on bone was poorly assessed, the effects of other dihydropyridine-type calcium channel blockers on bone cells and tissue has been investigated by some previous experimental and *in vitro* studies (Ritchie et al., 1994; Kosaka and Uchii, 1998; Nishiya and Sugimoto, 2001; Nishiya et al., 2002; Halici et al., 2008; Ushijima et al., 2010). Recently, Ushijima et al. (2010) showed that amlodipine directly inhibited osteoclast function and, consequently, prevented the reduction of bone density in SHR after 3 months of administration. The protective effect of amlodipine on bone loss was also demonstrated in ovariectomized Wistar rats (Halici et al., 2008). A previous study using osteoclast-enriched cultures demonstrated that dihydropyridine-type calcium channel blockers may bind to the  $\text{Ca}^{2+}$  channels of the osteoclasts, leading to increased intracellular calcium concentration and decreased bone resorption (Ritchie et al., 1994). In comparison with amlodipine and nifedipine, benidipine presented a greater ability to induce osteoblast



growth, differentiation and mineral deposition, probably due to a strong blockade of L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel and lipophilicity, which promote the retention of the drug in cell membranes (Kosaka and Uchii, 1998; Nishiya and Sugimoto, 2001; Nishiya et al., 2002). Since lercanidipine is also considered to be a long-acting highly lipophilic dihydropyridine, it could be speculated that the benefits observed, following its administration, in the cortical bone could be attributed to the effect of this drug on L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels in bone cells. However, additional studies should be performed to assess the direct action of lercanidipine on these cells.

Surgically-created critical-size defects are suitable models to evaluate the impact of local and systemic factors on bone repair. In the present study, standardized defects of 3 mm in diameter were created in rat tibia, in accordance with a previous study that demonstrated that this type of defect does not heal spontaneously in up to 7 weeks post-operative, being an appropriate model for evaluations of the newly-formed bone (Lewandrowski et al., 1999). Using the same wound-healing model, a recent study from our laboratory demonstrated that SHR presented a significantly lower bone formation during the early stages of repair (8 days post-operative), compared to NTR. However, in the present study, no influence of hypertension was observed on a later stage of bone healing (30 days post-operative). Therefore, it seems that hypertension has an initial negative effect on bone repair that does not last for a long time. In contrast to the present study, Pereira et al. (2007) found a higher amount of newly-formed bone in SHR than NTR at 21 days post-operative. These conflicting results may be explained by differences in experimental periods, rat age (data not shown) and gender (male and female) and by the localization (femur diaphysis) and size (2mm) of the defects. In this study, lercanidipine did not yield any impact on bone healing. A previous histometric study in Wistar rats showed a delay in bone formation in response to dihydropyridine (amlodipine) in alveolar wound healing;

however, differences in experimental designs including rat strain, type of wound and medication protocol hampered a more direct comparison with the present study.

In conclusion, treatment of SHR by lercanidipine during 6 weeks was able to increase the cortical BD and decrease the expression of TRAP+ cells in the tibia. Further studies should be performed to verify the clinical impact of these experimental findings.

## **CONFLICT OF INTEREST STATEMENT**

The authors report no conflicts of interest related to this study.

## **REFERENCES**

Barbagallo, M., Raddino, R., Restori, G., Boiardi, L., Novo, S., Strano, A, 1990. Alterations of calcium metabolism in spontaneously hypertensive rats. *Cardioscience*. 1, 105-107.

Bastos, M.F., Brilhante, F.V., Bezerra, J.P., Silva, C.A., Duarte, P.M., 2010a. Trabecular bone area and bone healing in spontaneously hypertensive rats: a histometric study. *Braz. Oral Res.* 24, 170-176.

Bastos, M.F., Brilhante, F.V., Gonçalves, T.E., Pires, A.G., Napimoga, M.H., Marques, M.R., Duarte, P.M., 2010b. Hypertension may affect tooth-supporting alveolar bone quality: a study in rats. *J. Periodontol.* 81, 1075-1083.

Burnier, M., Pruijm, M., Wuerzner, G., 2009. Treatment of essential hypertension with calcium channel blockers: what is the place of lercanidipine? *Expert. Opin. Drug. Metab. Toxicol.* 5, 981-987.

Cappuccio, F.P., Meilahn, E., Zmuda, J.M., Cauley, J.A., 1999. High blood pressure and bone mineral loss in elderly white women: a prospective study. *Lancet.* 354, 971-975.

Duncan, R.L., Akanbi, K.A., Farach-Carson, M.C., 1998. Calcium signals and calcium channels in osteoblastic cells. *Semin. Nephrol.* 18, 178-190.

Habermann, B., Eberhardt, C., Feld, M., Zichner, L., Kurth, A.A., 2007. Tartrate-resistant acid phosphatase 5b (TRAP 5b) as a marker of osteoclast activity in the early phase after cementless total hip replacement. *Acta Orthop.* 78, 221-225.

Hagiwara, H., Hiruma, Y., Inoue, A., Yamaguchi, A., Hirose, S., 1998. Deceleration by angiotensin II of the differentiation and bone formation of rat calvarial osteoblastic cells. *J. Endocrinol.* 156, 543-550.

Halici, Z., Borekci, B., Ozdemir, Y., Cadirci, E., Suleyman, H., 2008. Protective effects of amlodipine and lacidipine on ovariectomy-induced bone loss in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 579, 241-245.

Hatton, R., Stimpel, M., Chambers, T.J., 1997. Angiotensin II is generated from angiotensin I by bone cells and stimulates osteoclastic bone resorption in vitro. *J. Endocrinol.* 152, 5-10.

Hayman, A.R., 2008. Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) and the osteoclast/immune cell dichotomy. *Autoimmunity.* 41, 218-223.

Izawa, Y., Sagara, K., Kadota, T., Makita, T., 1985. Bone disorders in spontaneously hypertensive rat. *Calcif. Tissue Int.* 37, 605-607.

Johnson, R.J., Feig, D.I., Nakagawa, T., Sanchez-Lozada, L.G., Rodriguez-Iturbe, B., 2008. Pathogenesis of essential hypertension: historical paradigms and modern insights. *J. Hypertens.* 26, 381-391.

Kalfas, I.H., 2001. Principles of bone healing. *Neurosurg. Focus.* 15, 10(4):E1.

Kosaka, N., Uchii, M., 1998. Effect of benidipine hydrochloride, a dihydropyridine-type calcium antagonist, on the function of mouse osteoblastic cells. *Calcif. Tissue Int.* 62, 554-556.

Lewandrowski, K.U., Cattaneo, M.V., Gresser, J.D., Wise, D.L., White, R.L., Bonassar, L., Trantolo, D.J., 1999. Effect of a poly(propylene fumarate) foaming cement on the healing of bone defects. *Tissue Eng.* 5, 305-316.

Merke., J., Lucas, P.A., Szabo, A., Cournot-Witmer, G, Mall, G., Bouillon, R., Drüeke, T., Mann, J., Ritz, E., 1989. Hyperparathyroidism and abnormal calcitriol metabolism in the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension.* 13, 233-242.

Nishiya, Y., Kosaka, N., Uchii, M., Sugimoto, S., 2002. A potent 1,4-dihydropyridine L-type calcium channel blocker, benidipine, promotes osteoblast differentiation. *Calcif. Tissue Int.* 70, 30-39.

Nishiya, Y., Sugimoto, S., 2001. Effects of various antihypertensive drugs on the function of osteoblast. *Biol. Pharm. Bull.* 24, 628-633.

Pereira, A.C., Fernandes, R.G., Carvalho, Y.R., Balducci, I., Faig-Leite, H., 2007. Bone healing in drill hole defects in spontaneously hypertensive male and female rats' femurs. A histological and histometric study. *Arq. Bras. Cardiol.* 88, 104-109.

Raggatt, L.J., Partridge, N.C., 2010. Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. *J. Biol. Chem.* 285, 25103-25108.

Ritchie, C.K., Maercklein, P.B., Fitzpatrick, L.A., 1994. Direct effect of calcium channel antagonists on osteoclast function: alterations in bone resorption and intracellular calcium concentrations. *Endocrinology.* 135, 996-1003.

Sabbatini, M., Vitaioli, L., Baldoni, E., Amenta, F., 2000. Nephroprotective effect of treatment with calcium channel blockers in spontaneously hypertensive rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 294, 948-954.

Shimizu, H., Nakagami, H., Osako, M.K., Hanayama, R., Kunugiza, Y., Kizawa, T., Tomita, T., Yoshikawa, H., Ogihara, T., Morishita, R., 2008. Angiotensin II accelerates osteoporosis by activating osteoclasts. *FASEB J.* 22, 2465-2475.

Teófilo, J.M., Brentegani, L.G., Carvalho, T.L., 2001. A histometric study in rats of the effect of the calcium antagonist amlodipine on bone healing after tooth extraction. *Arch. Oral Biol.* 46, 375-379.

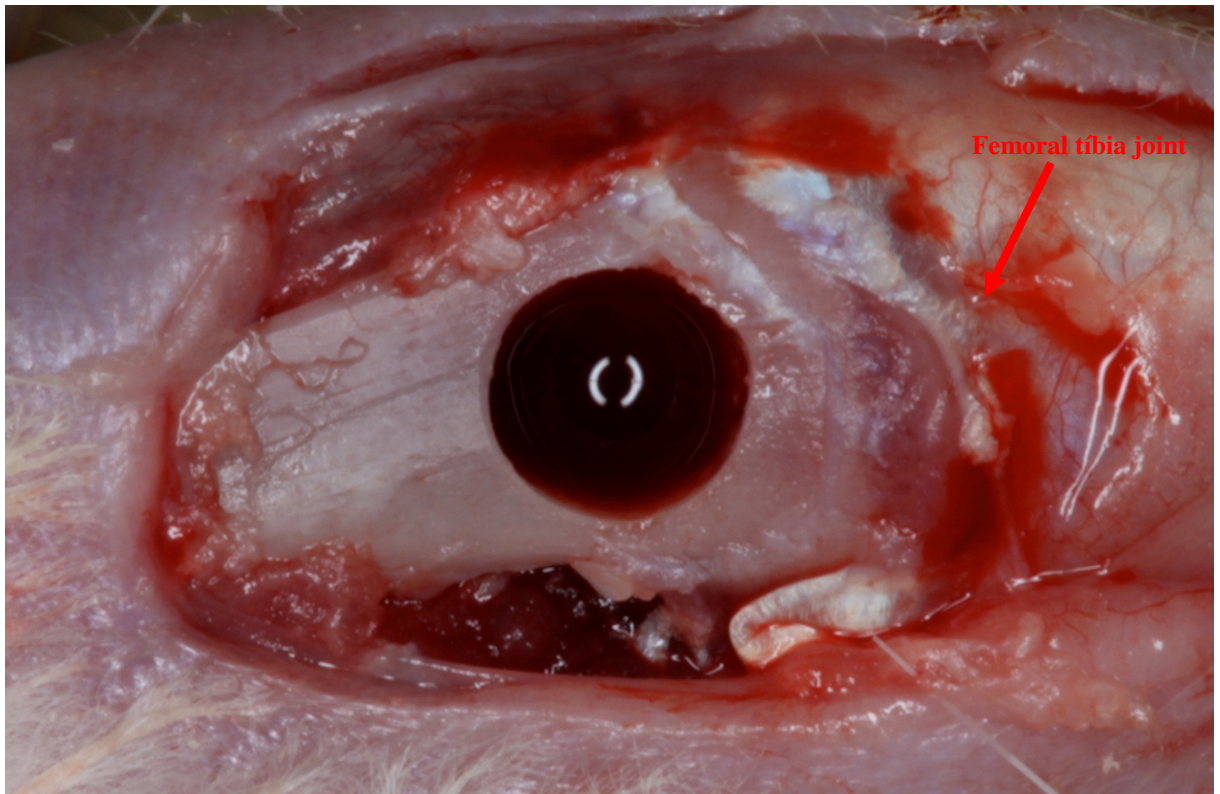
Tsuda, K., Nishio, I., Masuyama, Y., 2001. Bone mineral density in women with essential hypertension. *Am. J. Hypertens.* 14, 704-707.

Ushijima, K., Liu, Y., Maekawa, T., Ishikawa, E., Motosugi, Y., Ando, H., Tsuruoka, S., Fujimura, A., 2010. Protective effect of amlodipine against osteoporosis in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Eur. J. Pharmacol.* 635, 227-230.

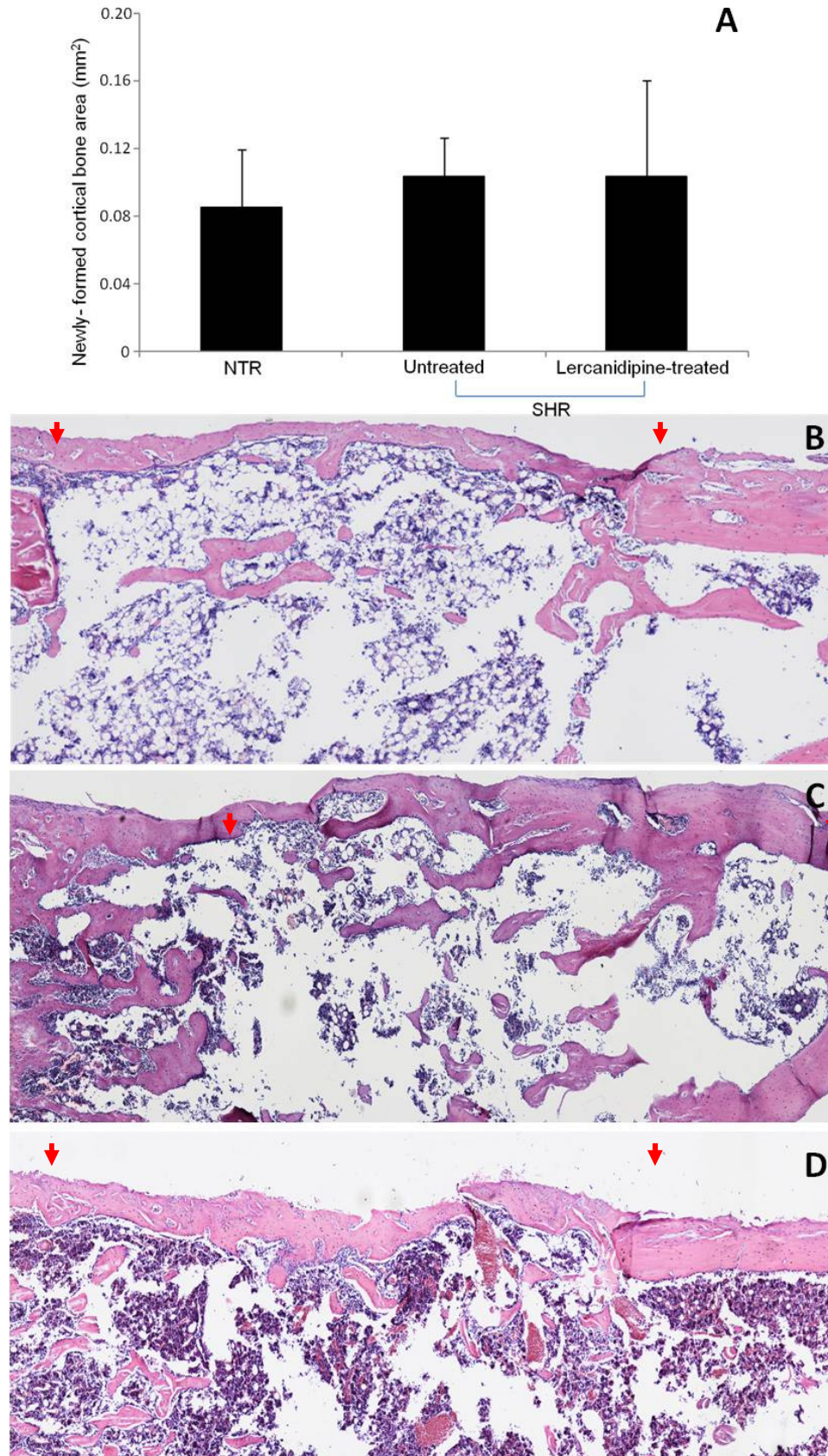
Vestergaard, P., Rejnmark, L., Mosekilde, L., 2009. Hypertension is a risk factor for fractures. *Calcif. Tissue Int.* 84, 103-111.

Wang, T.M., Hsu, J.F., Jee, W.S., 1993. Matthews JL. Evidence for reduced cancellous bone mass in the spontaneously hypertensive rat. *Bone Miner.* 20, 251-264.

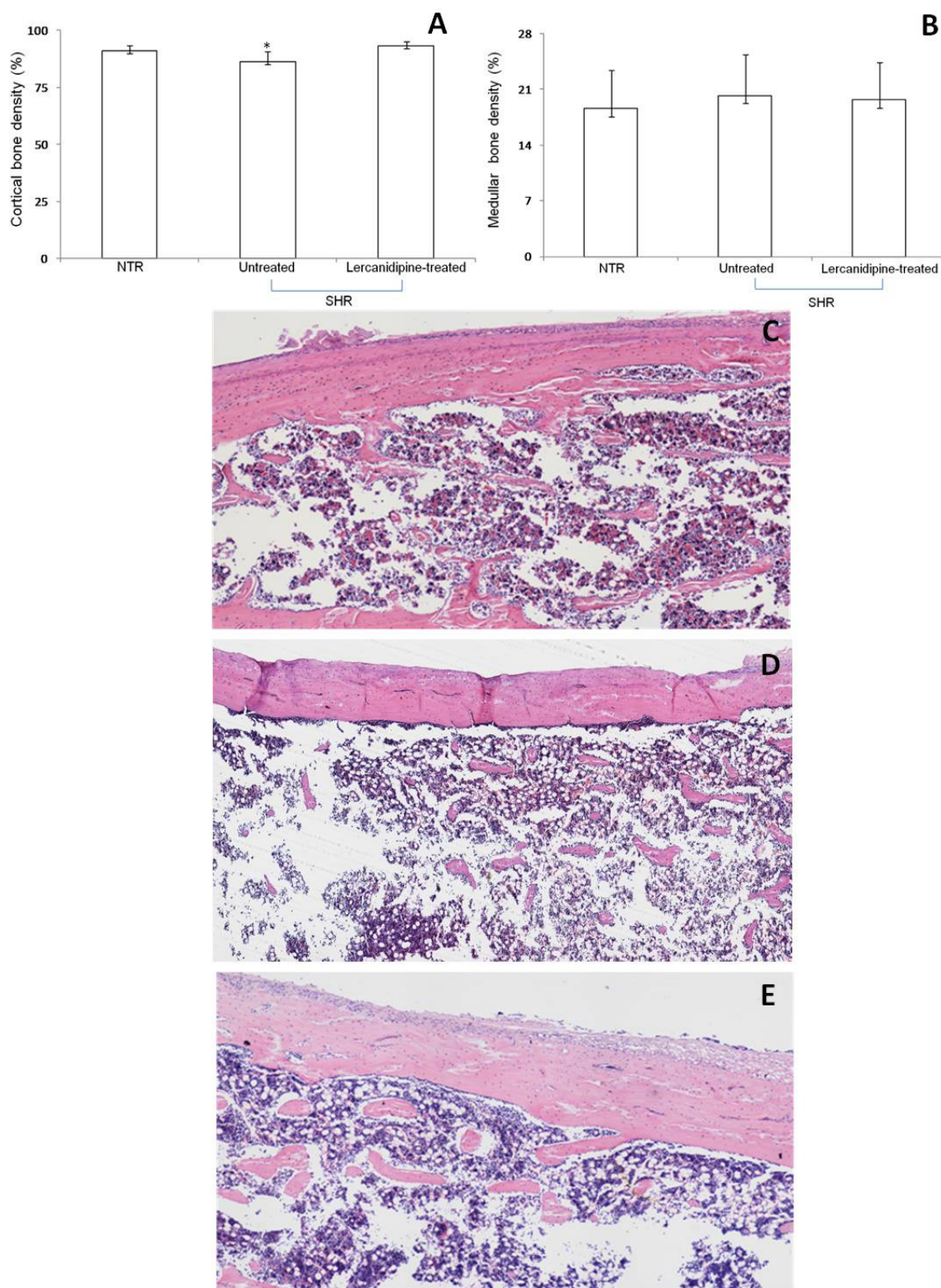
Wright, G.L., DeMoss, D., 2000. Evidence for dramatically increased bone turnover in spontaneously hypertensive rats. *Metabolism.* 49, 1130-1133.



**Figura 1:** Circumferential critical-size defect (3.0 x 3.0 mm) created on the methaphyseal area of the tibiae.



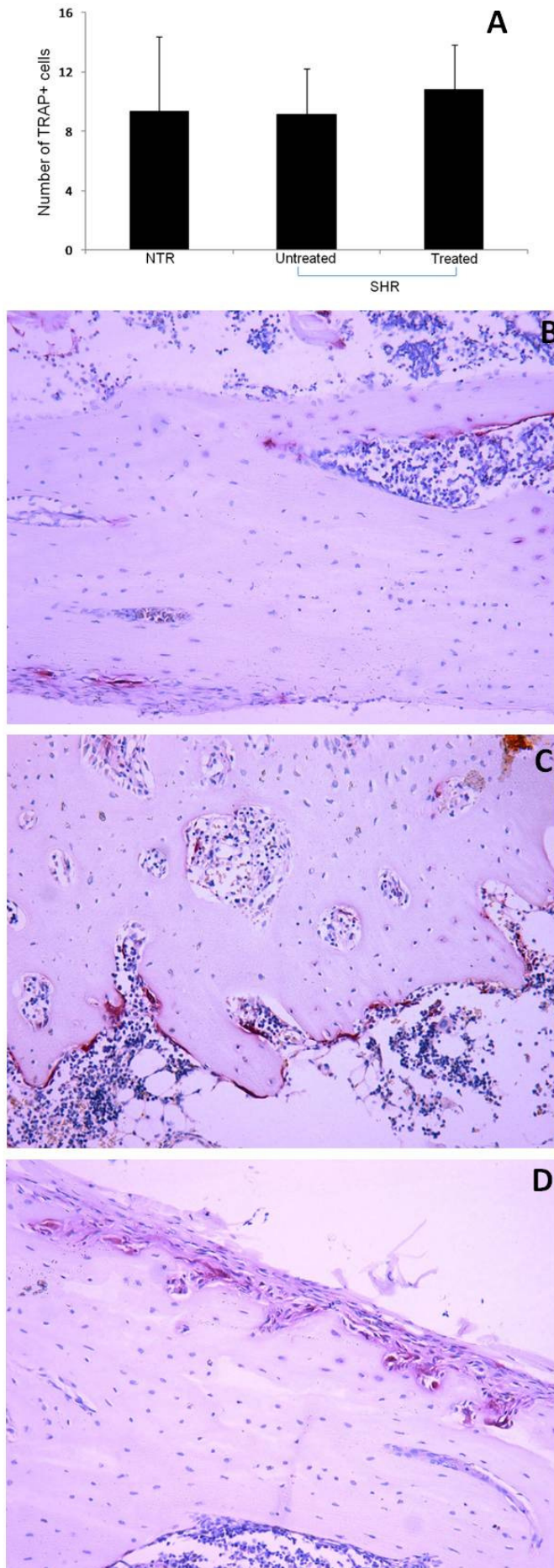
**Figure 2:** (A) Means ( $\pm$  SD) of the areas of newly-formed cortical bone (mm<sup>2</sup>) for NTR, untreated SHR and lercanidipine-treated SHR groups. Photomicrographs illustrating the areas of newly-formed bone of NTR (B), untreated SHR (C) and treated SHR (D), x40 magnification. The arrows delimitates the limit of the defect. There were no differences among groups by ANOVA ( $p = 0,55$ ).



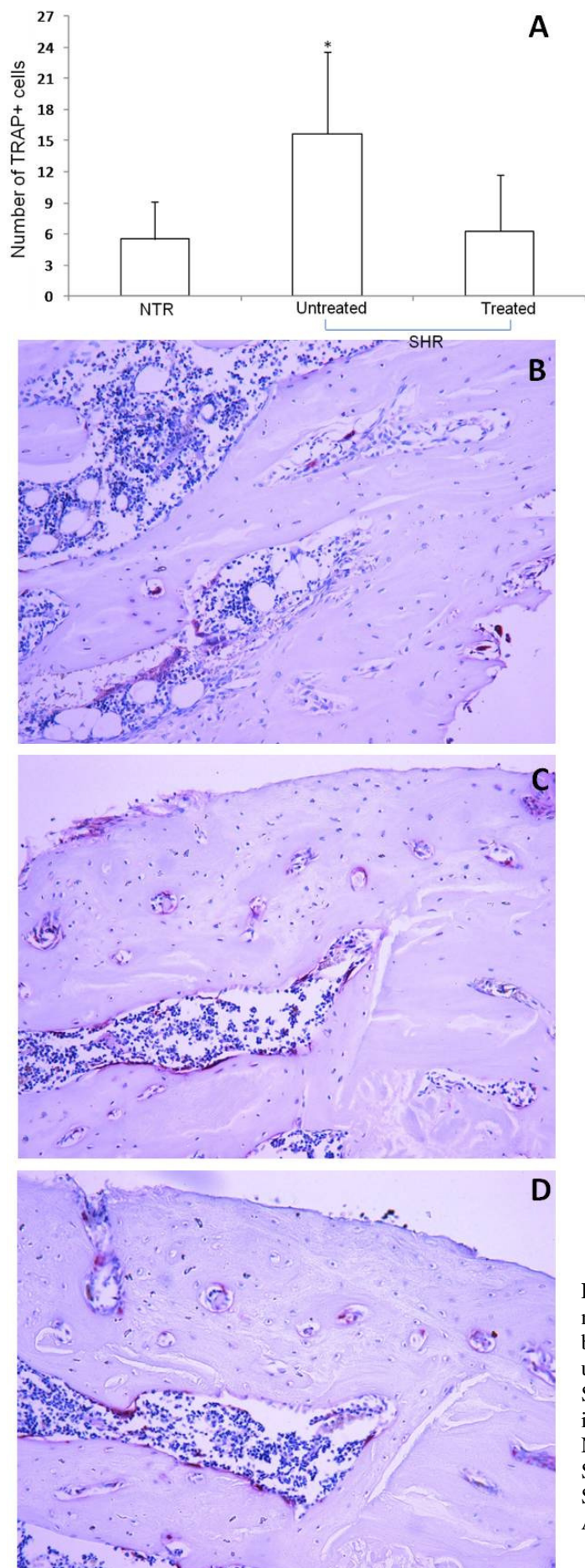
**Figure 3:** Means ( $\pm$  SD) of the (A) cortical and (B) medullar (%) BD for NTR, untreated SHR and lercanidipine-treated SHR groups. Photomicrographs illustrating the tibia without defect of NTR (C), untreated SHR (D) and treated SHR (E), x40 magnification.

\* Significant differences among groups by ANOVA and Tukey test ( $p < 0,05$ ).





**Figure 4:** (A) Means ( $\pm$  SD) of the number of TRAP+ cells in the newly-formed cortical bone for NTR, untreated SHR and lercanidipine-treated SHR groups. Photomicrographs illustrating the TRAP+ cells of NTR (B), untreated SHR (C) and treated SHR (D), x100 magnification. There were no differences among groups by ANOVA ( $p=0.56$ ).



**Figure 5:** (A) Means ( $\pm$  SD) of the number of TRAP+ cells in the cortical bone of the tibia without defect for NTR, untreated SHR and lercanidipine-treated SHR groups. Photomicrographs illustrating the tibia without defect of NTR (B), untreated SHR (C) and treated SHR (D), x 100 magnification. \* Significant differences among groups by ANOVA and Tukey test ( $p < 0.05$ ).

#### 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados do presente estudo demonstram que animais SHR apresentam uma menor densidade óssea cortical, níveis aumentados de células TRAP+ e que o tratamento com lercanidipina foi capaz de restabelecer estes efeitos prejudiciais da hipertensão sobre o tecido ósseo. Os efeitos negativos da hipertensão na densidade óssea, já foram relatados em estudos prévios que demonstraram que SHR apresentam distúrbios nos ossos longos como redução da espessura da cortical, da densidade óssea e do conteúdo de cálcio; assim como, aumento da atividade de reabsorção (Izawa et al., 1985; Barbagallo et al., 1990; Wright e DeMoss, 2000; Tsuda et al., 2001; Bastos et al., 2010a; Bastos et al., 2010b). Os resultados referentes à expressão aumentada de TRAP nos SHR estão de acordo com outros estudos da literatura que demonstraram um aumento no número de osteoclastos em SHR quando comparado aos normotensos (Merke et al., 1989; Wang et al., 1993). O aumento no número de osteoclastos em tecidos ósseos de SHR poderia ser explicado pelo fato da Ang II, um importante vasoconstrictor responsável pelo aumento da pressão arterial, ser capaz de promover a ativação de osteoclastos (Hatton et al. 1997, Hagiwara et al., 1998; Shimizu et al., 2008). Em 2008, Shimizu et al. demonstraram que a Ang II induziu a expressão de RANKL em osteoblastos via receptor tipo 1, o que desencadeou a ativação osteoclástica e o aumento do número de células TRAP+.

No presente estudo, também foi observado que o estado hipertensivo dos animais não foi capaz de influenciar no reparo ósseo. Para avaliação do reparo ósseo foi criado um defeito cirúrgico de tamanho crítico para avaliar o impacto de fatores locais e sistêmicos no reparo ósseo. O tamanho do defeito criado na tíbia foi de 3 mm de diâmetro, conforme demonstrado previamente por Lewandrowski et al. (1999), por ser um tipo de defeito que cicatriza completamente apenas após 7 semanas de criação, o que o torna um modelo apropriado para avaliação de neoformação óssea. Em um estudo recente, utilizando o mesmo modelo foi possível observar que SHRs apresentaram uma área significativamente menor de neoformação óssea após 8 dias da confecção do defeito, comparado aos animais normotensos. Entretanto, no presente estudo foi observado que a hipertensão não apresentou influência sobre o reparo ósseo após 30 dias da confecção do defeito, o que permite sugerir que a hipertensão apresenta efeitos negativos sobre as fases iniciais do reparo, porém não é capaz de afetar períodos mais tardios do mesmo. Novos estudos para avaliar o efeito da hipertensão sobre fatores envolvidos nas fases iniciais e

tardias do reparo ósseo devem ser realizados com a finalidade de esclarecer tais resultados. Em contraste ao presente estudo, Pereira et al. (2007) demonstrou uma maior quantidade de osso neoformado em SHR quando comparado aos normotensos após 21 dias da criação do defeito. Tais diferenças entre os resultados poderiam ser explicadas por diferenças quanto ao período experimental, idade e gênero dos ratos, localização (fêmur) e tamanho do defeito (2 mm).

O tratamento dos SHR com a dose de 2,5 mg/Kg/dia de lercanidipina foi baseado no estudo de Sabbattini et al., 2000, que demonstraram que este protocolo terapêutico foi eficiente para controlar a hipertensão em SHR após duas semanas de tratamento. É importante ressaltar que o resultado mais importante do presente estudo está no fato de que a lercanidipina foi capaz de reverter o efeito deletério da hipertensão sobre a densidade óssea cortical e o número de células TRAP+. Em acordo com o presente estudo, Bastos et al. (2010b) demonstraram a diminuição da expressão de TRAP no osso alveolar de suporte dos dentes em SHRs tratados com lercanidipina.

Em conclusão, o presente estudo demonstrou que o tratamento dos ratos hipertensos com lercanidipina durante 6 semanas, foi capaz de aumentar a densidade óssea cortical e diminuir a expressão de TRAP na tíbia. Estes resultados sugerem que a lercanidipina apresenta efeito benéfico sobre o tecido ósseo em ratos hipertensos. Novos estudos devem ser realizados para elucidar os mecanismos pelos quais este medicamento interfere no metabolismo ósseo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Allhat officers and coordinators. Major outcomes in high-risk hypertensive patients randomized to angiotensin-converting enzyme inhibitor or calcium channel blocker vs diuretic: the antihypertensive and lipid-lowering treatment to prevent heart attack trial (Allhat). *Jama*. 2002; 288: 2981-2987.

Anderson DM, Maraskovsky E, Billingsley WL, Dougall WC, Tometsko ME, Roux ER, et al. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature*. 1997; 390: 175-179.

Andresen MC, Krauhs JM, Brown AM. Relationship of aortic wall and baroreceptor properties during development in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Circ Res*. 1978; 43: 728-738.

Bainbridge A, Macfadyen R, Lees K, Reid J. A study of the acute pharmacodynamic interaction of ramipril and felodipine in normotensive subjects. *Br J clin Pharmacol*. 1991; 31: 148-153.

Bakris G, Sowers J, Ferdinand K. Blood pressure control in the patient with difficult-to-control hypertension: which agent for which patient? *Prev Cardiol*. 2008; 1: 42-49.

Barbagallo M, Raddino R, Restori G, Boiardi L, Novo S, Strano A. Alterations of calcium metabolism in spontaneously hypertensive rats. *Cardioscience*. 1990; 1: 105-107.

Bastos MF, Brilhante FV, Bezerra JP, Silva CA, Duarte PM. Trabecular bone area and bone healing in spontaneously hypertensive rats. A histometric study. *Braz Oral Res*. 2010a; 24(2): 170-176

Bastos MF, Brilhante FV, Gonçalves TE, Pires AG, Napimoga MH, Marques MR, Duarte PM. Hypertension may affect tooth-supporting alveolar bone quality: a study in rats. *J. Periodontol*. 2010b; 81: 1075-1083.

Batenburg WW, Krop M, Garrelds IM, de Vries R, de Bruin RJ, Burcklé CA, Müller

DN, Bader M, Nguyen G, Danser AH. Prorenin is the endogenous agonist of the (pro)renin receptor. Binding kinetics of renin and prorenin in rat vascular smooth muscle cells overexpressing the human (pro)renin receptor. *J Hypertens*. 2007 ; 25(12): 2441-2453.

Binggeli C, Corti R, Sudano I, Luscher T, Noll G. Effects of chronic calcium channel blockade on sympathetic nerve activity in hypertension. *Hypertension*. 2002; 39: 892-896.

Borghetti C. Lercanidipine in hypertension. *Vasc Health Risk Manag*. 2005; 1: 173-182.

Brenner R, Pérez GJ, Bonev AD, Eckman DM, Kosek JC, Wiler SW, Patterson AJ, Nelson MT, Aldrich RW. Vasoregulation by the beta1 subunit of the calcium-activated potassium channel. *Nature*. 2000; 407: 870-876.

Broulik PD, Tesar V, Zima T, Jirsa M. Impacto of antihypertensive therapy on skeleton: effects of enalapril and AT1 receptor antagonist losartan in female rats. *Physiol Res*. 2001; 50: 353-358.

Brown AM, Saum WR, Tuley FH. A comparison of aortic baroreceptor discharge in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Circ Res*. 1976; 39: 488-496.

Brown AM. Receptors under pressure. An update on baroreceptors. *Circ Res*. 1980; 46: 1-10.

Buchardt H, Enneking WF. Transplantation of bone. *Surg Clin North Am*. 1978; 58: 403-427.

Bunda S, Wang Y, Mitts T, Liu P, Arab S, Arabkhari M, Hinek A. Aldosterone stimulates elastogenesis in cardiac fibroblasts via mineralocorticoid receptor-independent action involving the consecutive activation of galpha13, c-Src, the insulin-like growth Factor-1 receptor, and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt. *J Biol Chem*. 2009; 284: 16633-16647.

Burt VL, Whelton P, Roccella EJ, Brown C, Cutler JA, Higgins M, Horan MJ, Labarthe D. Prevalence of hypertension in the US adult population. Results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1991. *Hypertension*. 1995; 25: 305-313.

Cappuccio FP, Meilahn E, Zmuda JM, Cauley JA. High blood pressure and bone-mineral loss in elderly white women: A prospective study. Study of Osteoporotic Fractures Research Group. *Lancet* 1999;354:971-975.

Connell J, Davies E. The New Biology of Aldosterone. *Journal of Endocrinology*. 2005; 186: 1-10.

Daftari TK, Whitesides TE Jr, Heller JG, et al. Nicotine on the revascularization of bone graft. An experimental study in rabbits. *Spine*. 1994; 19: 904-911.

DePalma AF, Rothman RH, Lewinnek GE, et al. Anterior interbody fusion for severe cervical disc degeneration. *Surg Gynecol Obstet*. 1972; 134: 755-758.

Fleckenstein A. Calcium Antagonists and Cardiovascular Disease. ed. by Opie LH, Raven Press, New York, 1984; 9-28.

Guyton AC, Coleman TG, Fourcade JC, Navar LG. Physiologic control of arterial pressure. *Bull N Y Acad Med*. 1969; 45: 811-820.

Guyton AC. Blood pressure control-special role of the kidneys and body fluids. *Science*. 1991; 252(5014): 1813-1816.

Habermann B, Eberhardt C, Feld M, Zichner L, Kurth A. Tartrate-resistant acid phosphatase 5b (TRAP 5b) as a marker of osteoclast activity in the early phase after cementless total hip replacement. *Acta Orthop*. 2007; 78: 221-225.

Hagiwara H, Hiruma Y, Inoue A, Yamaguchi A, Hirose S. Deceleration by angiotensin II of the differentiation and bone formation of rat calvarial osteoblastic cells. *J. Endocrinol*. 1998; 156: 543-550.

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: 241-245.

Hatton R, Stimpel M, Chambers TJ. Angiotensin II is generated from angiotensin I by bone cells and stimulates osteoclastic bone resorption in vitro. *J Endocrinol.* 1997; 152: 5-10.

Hayman AR. Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) and the osteoclast/immune cell dichotomy. *Autoimmunity.* 2008; 41: 218-223.

Hardy B, Bartle W, Myers M, Bailey D, Edgar B. Effect of indomethacin on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of felodipine. *Br J clin Pharmacol.* 1988; 26: 557-562.

Hazenberg JG, Freeley M, Foran E, Lee TC, Taylor D. Microdamage: A cell transducing mechanism based on ruptured osteocyte processes, *J Biomech* 39 (2006), 2096–2103.

Hofbauer LC, Heufelder AE. Osteoprotegerin ligand and osteoprotegerin: new concepts of the pathogenesis and therapy of metabolic bone disease. *Dtsch Med Wochenschr.* 2001; 126: 145-150.

Hofbauer LC, Schoppet M. Clinical implications of the osteoprotegerin/RANKL/RANK system for bone and vascular diseases. *Jama.* 2004; 292: 490-495.

Huang PL, Huang Z, Mashimo H, Bloch KD, Moskowitz MA, Bevan JA, Fishman MC. Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature.* 1995; 377: 239-242.

Inoue T, Moriya A, Goto K, Tanaka T, Inazu M. What Is the difference of bone growth in SHR and SD rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl.* 1995; 22: 242-243.

Ikeda T, Kasai M, Utsuyama M, Hirokawa K. Determination of three isoforms of the receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand and their differential expression in bone and thymus. *Endocrinology.* 2001; 142: 1419-1426.

Izawa Y, Sagara K, Kadota T, Makita T. Bone disorders in spontaneously hypertensive rat. *Calcif. Tissue Int.* 1985; 37: 605-607.



James MN, Sielecki AR. Stereochemical analysis of peptide bond hydrolysis catalyzed by the aspartic proteinase penicillopepsin. *Biochem J*. 1985; 24: 3701-3703.

Jennings D, Kalus J, O'Dell K. Aldosterone receptor antagonism in heart failure. *Pharmacotherapy*. 2005; 25: 1126-1133.

Kalfas IH. Principles of bone healing. *Neurosurg Focus*. April, 2001; 10(4).

Kannel WB. Elevated systolic blood pressure as a cardiovascular risk factor. *Am J Cardiol*. 2000; 85: 251-255.

Kats AM, Hager WD, Messineo FC, Pappano AJ. *Am J med*. 1984; 77: 2-10.

Kong YY, Boyle WJ, Penninger JM. Osteoprotegerin ligand: a regulator of immune responses and bone physiology. *Immunol Today*. 2000; 21: 495-502.

Kosaka N, Uchii M. Effect of benidipine hydrochloride, a dihydropyridine-type calcium antagonist, on the function of mouse osteoblastic cells. *Calcif. Tissue Int*. 1998; 62: 554-556.

Larijani B, Bekheirnia M, Soltani A, Khalili-Far A, Adibi H, Jalili R. Bone mineral density is related to blood pressure in men. *Am J Of Hum Biol*. 2004; 16: 168-171.

Leibbrandt A, Penninger J. RANK/RANKL: regulators of immune responses and bone physiology. *Ann NY Acad Sci*. 2008; 1143: 123-130.

Lerner UH. Inflammation-induced bone remodeling in periodontal disease and the influence of post-menopausal osteoporosis. *J Dent Res*. 2006; 85: 596-597.

Lewandrowski KU, Cattaneo MV, Gresser JD, Wise DL, White RL, Bonassar L, Trantolo DJ. Effect of a poly(propylene fumarate) foaming cement on the healing of bone defects. *Tissue Eng*. 1999; 5: 305-316.

Liang H, Ma Y, Pun S, Stimpel M, Jee W. Aging- and ovariectomy-related skeletal changes in spontaneously hypertensive rats. *Anat Rec*. 1997; 249: 173-180.

Lifton RP, Gharavi AG, Geller DS. Molecular mechanisms of human hypertension. Cell. 2001;104: 545-546.

Lonn EM, Yusuf S, Jha P, Montague TJ, Teo KK, Benedict CR, Pitt B. Emerging role of angiotensin-converting enzyme inhibitors in cardiac and vascular protection. Circulation. 1994; 90: 2056-2059.

Ma Y, Stimpel M, Liang H, Pun S, Jee W. Impact of antihypertensive therapy on the skeleton: effects of moexipril and hydrochlorothiazide on osteopenia in spontaneously hypertensive ovariectomized rats. Journal of Endocrinology. 1997; 154: 467-474.

McCarron DA. Low serum concentrations of ionized calcium in patients with hypertension. N Engl J Med. 1982; 307: 226-228.

MacGregor GA, Cappuccio FP. The kidney and essential hypertension: a link to osteoporosis?. J Hypertension. 1993; 11: 781-785.

Makarounas-Kirchmann K, Glover-Koudounas S, Ferrari P. Results of a meta-analysis comparing the tolerability of lercanidipine and other dihydropyridine calcium channel blockers. Clin Ther. 2009; 31: 1652-1653.

Massicotte J, Viens A, Yao M, Leonardi A, Sironi G, Wang H, Dumont .Effects of lercanidipine on coronary reactivity and myocardial remodeling in transition to heart failure in cardiomyopathic hamsters. Acta Pharmacol Sin. 2003; 24 : 199-206.

Mehta PK, Griendling KK. Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. Am J Physiol Cell Physiol. 2007; 292: 82-87.

Ménard J, Guyene TT, Peyrard S, Azizi M. Conformational changes in prorenin during renin inhibition in vitro and in vivo. J Hypertens. 2006; 24: 529-534.

Merke J, Lucas PA, Szabo A, Cournot-Witmer G, Mall G, Bouillon R, Drüeke T, Mann J, Ritz E. Hyperparathyroidism and abnormal calcitriol metabolism in the spontaneously hypertensive rat. Hypertension. 1989; 13: 233-242.

Metz J, Karanja N, Young E, Morris C, McCarron D. Bone mineral density in spontaneous hypertension: differential effects of dietary calcium and sodium. *Am J Med Sci.* 1990; 300: 225-230.

Mosterd A, D'Agostino RB, Silbershatz H, Sytkowski PA, Kannel WB, Grobbee DE, Levy D. Trends in the prevalence of hypertension, antihypertensive therapy, and left ventricular hypertrophy from 1950 to 1989. *N. Engl. J. Med.* 1999; 340: 1221-1227.

Nishiya Y, Sugimoto S. Effects of Various Antihypertensive Drugs on the function of osteoblast. *Biol Pharm Bull.* 2001; 24: 628-633.

Noble BS, Stevens H, Loveridge N, Reeve J. Identification of apoptotic changes in osteocytes in normal and pathological human bone, *Bone* 20 (1997), 273–282.

O'Brien EA, Williams JH, Marshall MJ. Osteoprotegerin is produced when prostaglandin synthesis is inhibited causing osteoclasts to detach from the surface of mouse parietal bone and attach to the endocranial membrane. *Bone.* 2001; 28: 208-214.

Pereira AC, Fernandes RG, Carvalho YR, Balducci I, Faig-Leite H. Bone healing in drill hole defects in spontaneously hypertensive male and female rats' femurs. A histological and histometric study. *Arq. Bras. Cardiol,* 2007; 88: 93-97.

Raggatt LJ, Partridge NC. Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. *J. Biol. Chem.* 2010; 285: 25103-25108.

Reaven G. Metabolic syndrome: pathophysiology and implications for management of cardiovascular disease. *Circulation.* 2006; 106: 286-288.

Riebel ED, Boden SD, Whiteside TE, et al. The effect of nicotine on incorporation of cancellous bone graft in an animal model. *Spine.* 1995; 20: 2198-2202.

Reudelhuber TL, Ramla D, Chiu L, Mercure C, Seidah NG. Proteolytic processing of human prorenin in renal and non-renal tissues. *Kidney Int.* 1994; 46: 1522-1524.

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.

Roberts HC, Knott L, Avery NC, Cox TM, Evans MJ, Hayman AR. Altered collagen in tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP)-deficient mice: a role for TRAP in bone collagen metabolism. *Calcif Tissue Int*. 2007; 80: 400-500.

Rocha R, Funder J. The pathophysiology of aldosterone in the cardiovascular system. *Ann NY Acad Sci*. 2002; 970: 89-90.

Rubenstein I, Yong T, Rennard SI, et al. Cigarette smoke extract attenuates endothelium-dependent arteriolar dilation in vivo. *Am J Physiol*. 1991; 261: 1913-1918.

Sabbatini M, Vitaioli L, Baldoni E, Amenta F. Nephroprotective effect of treatment with calcium channel blockers in spontaneously hypertensive rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther*. 2000; 294: 948-954.

Shimizu H, Nakagami H, Osako M, Hanayama R, Kunugiza Y, Kizawa T, Tomita T, Yoshikawa H, Ogihara T, Morishita R. Angiotensin II accelerates osteoporosis by activating osteoclasts. *Faseb J*. 2008; 22: 2465-2475.

Silcox DH III, Daftari T, Boden SD, et al. The effects of nicotine on spinal fusion. *Spine*. 1995; 20: 1549-1553.

Silveira NP, Moreira ED, Drager LF, Silva GJ, Krieger EM. Effects of sinoaortic denervation on hemodynamic parameters during natural sleep in rats. *Sleep*. 2008; 31: 328-333.

Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Luthy R, et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*. 1997; 89: 309-319.

Soysa NS, Alles N. NF Kappa Beta functions in osteoclast. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009; 378: 1-5.

Tang KM, Wang GR, Lu P, Karas RH, Aronovitz M, Heximer SP, Kaltenbronn KM, Blumer KJ, Siderovski DP, Zhu Y, Mendelsohn ME. Regulator of G-protein signaling-2 mediates vascular smooth muscle relaxation and blood pressure. *Nat Med.* 2003; 9: 1506-1512.

Teófilo JM, Brentegani LG, 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: 375-379.

Tsuda K, Nishio I, Masuyama Y. Bone mineral density in women with essential hypertension. *Am J Hypertens.* 2001;14:704-707.

US Renal Data System. *USRDS 1999 Annual Data Report.* The National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, Bethesda, MD. 1999.

Ushijima K, Liu Y, Maekawa T, Ishikawa E, Motosugi Y, Ando H, Tsuruoka S, Fujimura A. Protective effect of amlodipine against osteoporosis in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Eur. J. Pharmacol.* 2010; 635, 227-230.

Verborgt O, Gibson GJ, Schaffler MB. Loss of osteocyte integrity in association with microdamage and bone remodeling after fatigue in vivo, *J Bone Miner Res* 15 (2000), 60–67.

Verdecchia P, Angeli F, Mazzotta G, Gentile G, Reboldi G. The rennin angiotensin system in the development of cardiovascular disease: role of aliskiren in risk reduction. *Vasc Health Risk Manag.* 2008; 4: 971-981.

Vestergaard P, Rejnmark L, Mosekilde L. Hypertension is a risk factor for fractures. *Calcif. Tissue Int.* 2009; 84: 103-111.

Wada T, Nakashima T, Hiroshi N, Penninger JM. RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease. *Trends Mol Med.* 2006; 12: 17-25.

Wang T, Hsu J, Jee W, Matthews J. Evidence for reduced cancellous bone mass in the spontaneously hypertensive rat. *Bon and Min.* 1993; 20: 251-254.

Wirtz S, Herzig S. Molecular mechanisms of vasoselectivity of the 1,4-dihydropyridine lercanidipine. *Br J Pharmacol.* 2004; 142: 275–284.

Wright G, DeMoss D. Evidence for dramatically increased bone turnover in spontaneously hypertensive rats. *Metabolism.* 2000; 49: 1130-1133.

Wright HL, McCarthy, Middleton J, Marshall MJ. RANK, RANKL and Osteoprotegerin in bone biology and disease. *Curr Rev Musculoskelet Med.* 2009; 2: 56-64.

Zhu Y, Bian Z, Lu P, Karas RH, Bao L, Cox D, Hodgins J, Shaul PW, Thoren P, Smithies O, Gustafsson JA, Mendelsohn ME. Abnormal vascular function and hypertension in mice deficient in estrogen receptor beta. *Science.* 2002; 295: 505-508.