

PAOLO GADIOLI LA GUARDIA

**INIBIÇÃO, POR SINVASTATINA, DA RESPIRAÇÃO MITOCONDRIAL DE
BIÓPSIAS DE MÚSCULO ESQUELÉTICO E FÍGADO DE RATOS**

CAMPINAS

2010

PAOLO GADIOLI LA GUARDIA

**INIBIÇÃO, POR SINVASTATINA, DA RESPIRAÇÃO MITOCONDRIAL DE
BIÓPSIAS DE MÚSCULO ESQUELÉTICO E FÍGADO DE RATOS**

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Fisiopatologia Médica, área de concentração de Medicina experimental.

ORIENTADOR: PROF. DR. ANIBAL E. VERCESI

COLABORADORA: PROFA. DRA. LUCIANE CARLA ALBERICI

CAMPINAS

2010

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

G931i Guardia, Paolo Gadioli La
Inibição, por simvastatina, da respiração mitocondrial de biópsia de músculo esquelético e fígado de ratos / Paolo Gadioli La Guardia. Campinas, SP : [s.n.], 2010.

Orientadores : Aníbal Eugênio Vercesi; Luciane Carla Alberici
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Simvastatina. 2. Biópsia. 3. Mitocôndria. 4. Músculo esquelético. 5. Fígado. 6. Carnitina. 7. Ubiquinona. 8. Consumo de oxigênio. I. Vercesi, Aníbal Eugênio. II. Alberici, Luciane Carla. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Título em inglês : Inhibition by simvastatin of mitochondrial respiration from skeletal muscle and liver rat biopsies

- Keywords:**
- Simvastatin
 - Biopsy
 - Mitochondria
 - Muscle, skeletal
 - Liver
 - Carnitine
 - Ubiquinone
 - Oxygen consumption

Titulação: Mestre em Fisiopatologia Médica
Área de Concentração: Medicina Experimental

Banca examinadora:

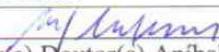
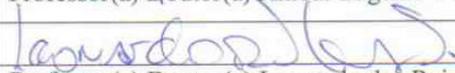
Prof.º. Dr.º. Aníbal Eugênio Vercesi
Prof.ª. Dr.ª. Helena Coutinho Franco de Oliveira
Prof.º. Dr.º. Leonardo dos Reis Silveira

Data da defesa: 24-02-2010

Banca examinadora de Dissertação de Mestrado

Paolo Gadioli La Guardia

Orientadora(a): Prof(a). Dr(a). Aníbal Eugênio Vercesi

Membros:
 Professor(a) Doutor(a) Aníbal Eugênio Vercesi
 Professor(a) Doutor(a) Leonardo dos Reis Silveira
 Professor(a) Doutor(a) Helena Coutinho Franco De Oliveira

Curso de pós-graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 24/02/2010

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Bioenergética, Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental (NMCE), Departamento de Fisiopatologia Médica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas(UNICAMP), sob a orientação do Professor Dr. Aníbal Eugênio Vercesi, e colaboração da Professora Dra. Luciane Carla Alberici, na vigência de auxílios concedidos pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Diabetes e Obesidade (INCT), do Conselho Nacional para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo ao Ensino e Pesquisa e Extensão da Universidade Estadual de Campinas (FAEPEX-Unicamp).

*“A mente que se abre a uma nova ideia,
jamais voltará ao seu tamanho original.”*

Albert Einstein

DEDICATÓRIA

A minha família
por acreditar, fazendo com que eu acreditasse,
tornando assim, um sonho possível
Adrielly, Flavinha e agora Gustavo.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador professor Dr. Aníbal Eugênio Vercesi por abrir as portas do seu laboratório, pela orientação e por proporcionar boas condições de trabalho.

A minha esposa Adrielly pelo apoio, paciência e por me dar forças no dia a dia fazendo com que eu olhasse com um olhar mais positivo as tarefas mais difíceis.

Aos meus filhos Flávia e Gustavo simplesmente por abrirem um sorriso e estarem me esperando sempre prontos a me alegrar.

Aos meus pais Renato e Sheila por proporcionarem sempre condições para que eu pudesse progredir, e pelos ensinamentos sobre caráter e boa conduta.

Aos meus irmãos Rogério pelos conselhos e amizade; e Giuliano por me encorajar a estar presente nesta “vida de cientista”.

A professora Luciana Carla Alberici pela orientação, paciência e dores de cabeça.

Aos professores Dr. Roger Frigério Castilho e Dra. Helena Coutinho Franco de Oliveira por pequenas participações, opiniões e conselhos que foram de grande valia.

A meus colegas de laboratório: Ana Catarina, Ângela, Bruno, Carina, Daniela, Felipe, Juliana, Karina, Márcia, Mariana, Rute, Sandra, Tiago, Túlio, pelos ensinamentos e discussões, além dos meus “irmãos” Carlos, Franco e Leandro pelo apoio e incentivo.

Aos técnicos Roberto, Edilene, Elisângela e Carol pelos ensinamentos no isolamento de mitocôndrias, tratamentos dos animais, e muitos outros.

A todas as pessoas não citadas aqui que participaram diretamente ou indiretamente no andamento deste trabalho.

LISTA DE ABREVIATURAS

ACAT - acil colesterol acil transferase

ADP – adenosina difosfato

AG – ácido graxo

apoLP - Apolipoproteína

ATP – adenosina trifosfato

Ca²⁺ - íon cálcio

CK – creatina quinase

CoA – Coenzima A

COL - colesterol

DNA - ácido desoxirribonucléico

ERNs – espécies reativas de nitrogênio

EROs - espécies reativas de oxigênio

FADH₂ – Flavina adenina dinucleotídeo reduzido

FCCP – *carbonyl cyanide p – (Trifluoromethoxy) Phenyl-Hydrazone*

Fe²⁺ - ferro

H⁺ - hidrogênio

H₂O - água

H₂O₂ – peróxido de hidrogênio

HDL – lipoproteína de alta densidade

HMG-CoA - 3-hidroxi-3-metilglutaril-Coenzima A

OH· – radical hidroxila reativo

IDL – lipoproteína de densidade intermediária

LDL - lipoproteína de baixa densidade

LP – lipoproteína

NAD - nicotinamida adenina dinucleotídeo (estado oxidado)

NADP - nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (estado oxidado)

NADH – nicotinamida adenina dinucleotídeo (estado reduzido)

NADPH - nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (estado reduzido)

NO – óxido nítrico

O₂ - oxigênio
O₂^{•-} - radical superóxido
Q10 – coenzima Q10
QM - quilomícrons
TG - triglicérides
TPM – transição de permeabilidade mitocondrial
UQ – ubiquinona (forma oxidada)
UQH[•] – radical semiquinona
UQH₂ - ubiquinona (forma reduzida)
VLDL - lipoproteína de densidade muito baixa
 $\Delta\mu\text{H}^+$ - gradiente eletroquímico de prótons
 ΔpH – gradiente químico de prótons
 $\Delta\Psi$ - potencial elétrico de membrana
EGTA - glico – bis (â-aminoetil éter)-N,N,N',N' – ácido tetraacético
MgCl₂ – cloreto de magnésio
BSA - Albumina soro bovina
HEPES - (N-[2-hydroxyethyl]piperazine-N' –[2-ethanesulfonic acid])

ÍNDICE:

	PÁG.
RESUMO	XIV
ABSTRACT	XVI
1 - INTRODUÇÃO	17
1.1 – Mitocôndrias	19
1.2 - Metabolismo de lipídeos, hipercolesterolemia e aterosclerose	23
1.3 - Estatinas	27
1.4 – Estatinas e miopatia	29
1.5 - L-carnitina	32
2 - OBJETIVOS	36
2.1 - Objetivo geral	37
2.2 – Objetivos específicos	37
3 – MATERIAL E MÉTODOS	38
3.1 - Reagentes	39
3.2 - Animais	39
3.3 - Tratamento com Sinvastatina e L-carnitina	39
3.4 - Preparação das biópsias de músculo esquelético	39
3.5 - Preparação das biópsias de fígado	42
3.6 - Isolamento de mitocôndrias de músculo de ratos	42
3.7 - Dosagem de proteína	42
3.8 - Condições experimentais	43
3.9 - Consumo de oxigênio de biópsias e mitocôndrias isoladas	43
3.10 - Dosagem da produção de lactato em biópsias de músculo esquelético	43
3.11 - Análises estatísticas	44
4 - RESULTADOS	45
5 - DISCUSSÃO	60
6 - CONCLUSÃO	67
7 - REFERÊNCIAS	69

LISTA DE FIGURAS

		PÁG.
Figura 1	Esquema simplificado da cadeia respiratória e da teoria quimiosmótica aplicada à mitocôndria.	21
Figura 2	Estrutura química das estatinas e do HMG-CoA.	28
Figura 3.	Via de síntese do colesterol.	31
Figura 4	Transporte de ácidos graxos de cadeia longa para a matriz mitocondrial.	34
Figura 5	Permeabilização por ação de saponina nas membranas plasmáticas de biópsias de músculo esquelético.	41
Figura 6.	Efeito de concentrações crescentes de sinvastatina sobre a velocidade de respiração mitocondrial em biópsias de músculo sóleo de ratos Wistar.	47
Figura 7.	Velocidades de respiração mitocondrial em biópsias musculares na presença de sinvastatina e mevalonato.	48
Figura 8.	Velocidades de respiração mitocondrial em biópsias musculares na presença de sinvastatina e co-enzima Q10.	49
Figura 9.	Velocidades de respiração mitocondrial em biópsias musculares na presença de sinvastatina e L-carnitina.	50
Figura 10.	Velocidades de respiração de mitocôndrias isoladas de músculo esquelético na presença de DMSO e sinvastatina.	51
Figura 11	Produção de lactato em biópsias musculares tratadas com sinvastatina.	53
Figura 12	Velocidades de respiração mitocondrial em biópsias de fígado na presença de sinvastatina.	55
Figura 13	Velocidades de respiração mitocondrial em biópsias de fígado na presença de sinvastatina e mevalonato.	56
Figura 14	Velocidades de respiração mitocondrial em biópsias de fígado na presença de sinvastatina e coenzima Q10.	57
Figura 15	Velocidades de respiração mitocondrial em biópsias de fígado na presença de sinvastatina e L-carnitina.	58
Figura 16	Velocidades de respiração mitocondrial em biópsias de músculo esquelético de ratos tratados com sinvastatina e ou L-carnitina.	59

RESUMO

Inibidores da 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA redutase (estatinas) são fármacos utilizados para diminuir os níveis plasmáticos de colesterol e são, geralmente, seguros e bem tolerados. Ocasionalmente esses fármacos induzem miotoxicidade, como miopatia e rabdomiólise, e hepatotoxicidade. Neste trabalho investigou-se o mecanismo, *in vitro* e *in vivo*, pelo qual as estatinas atuam sobre a respiração mitocondrial de biópsias de músculo esquelético e de fígado de ratos. A incubação (1 hora) de biópsias permeabilizadas de músculo sóleo (2-3 mg) com doses crescentes de sinvastatina reduziu a velocidade de respiração mitocondrial estimulada por ADP ou FCCP de forma dose-dependente e significativa ($p < 0,05$). A inibição causada por 1 μM de sinvastatina nas velocidades de respiração estimuladas por ADP e FCCP foi de respectivamente cerca de 25% e 27%. Em contraste, não houve alteração significativa na velocidade de respiração de repouso. O efeito de 1 μM de sinvastatina foi inibido pela incubação concomitante com 100 μM de mevalonato (produto da enzima HMG-CoA redutase), ou 10 μM de coenzima Q10 (um outro produto da via de síntese do colesterol). A redução na velocidade de respiração também foi inibida pela incubação concomitante com 1 mM de L-carnitina. A incubação com sinvastatina aumentou de forma significativa ($p < 0,05$) a produção de lactato pelas biópsias musculares em cerca de 26%, efeito protegido pela incubação concomitante com mevalonato ou coenzima Q10 ou L-carnitina na mesma concentração descrita anteriormente. Por outro lado, esta mesma concentração de sinvastatina não provocou efeito algum sobre as velocidades de respiração de mitocôndrias isoladas de músculo de ratos. A incubação (1 hora) de biópsias hepáticas (2-3 mg) com doses crescentes de sinvastatina reduziu a respiração mitocondrial estimulada por ADP ou FCCP, sem alterar a respiração de repouso. Sinvastatina (5 μM) inibiu significativamente ($p < 0,05$) a respiração estimulada por ADP e FCCP em cerca de 24% e 29% respectivamente. Esta inibição não foi sensível a 100 μM de mevalonato ou 10 μM de coenzima Q10 ou 1 mM de L-carnitina. Biópsias de músculo sóleo de ratos tratados durante 15 dias com 100 mg / kg (gavagem) de sinvastatina

apresentaram velocidades de consumo de oxigênio reduzidas em todos os estados respiratórios. Este efeito foi inibido pela administração concomitante de L-carnitina 200 mg / kg (gavagem).

ABSTRACT

3-Hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase inhibitors (statins) are safe and well-tolerated therapeutic drugs, that occasionally induce myotoxicity such as myopathy and rhabdomyolysis, and hepatotoxicity. Here, we investigated *in vitro* and *in vivo* the mechanisms of statin-induced toxicity on mitochondrial respiration of rat skeletal muscle and liver biopsies. One hour incubation of permeabilized *soleus* muscle biopsies (2-3 mg) with increasing doses of simvastatin (1 to 40 μ M) reduced ADP- or FCCP-stimulated mitochondrial respiration rate in a dose-dependent manner. The inhibition of ADP- or FCCP-stimulated mitochondrial respiration rate by simvastatin 1 μ M was 25% and 27%, respectively. No changes in rest respiration rate was observed. Simvastatin (1 μ M) inhibition of muscle respiration was prevented by coincubation with 100 μ M mevalonate, 10 μ M coenzyme Q10 or 1 mM L-carnitine. Simvastatin (1 μ M) also increased lactate production in muscle biopsies by 26%; this effect was prevented by the coincubation with mevalonate, coenzyme Q10 or L-carnitine. At the same concentration, simvastatin did not inhibit the respiration of isolated skeletal muscle mitochondria suggesting that simvastatin effect on mitochondrial respiration is not direct. Incubation (1 hour) of liver biopsies (2-3 mg) with increasing doses of simvastatin reduced ADP- or FCCP-stimulated mitochondrial respiration rate without changes in rest respiration rate. The lowest simvastatin concentration able to reduce liver biopsies respiration rates was 5 μ M, which promoted 24% and 29% inhibition in ADP- or FCCP-stimulated respiration rates, respectively. This was not modified by mevalonate, coenzyme Q10 or L-carnitine. *Soleus* muscle biopsies from rats treated during 15 days with simvastatin (100 mg/kg, p.o.) presented L-carnitine sensitive inhibition of oxygen consumption rate in all respiratory states.

1 - INTRODUÇÃO

Segundo dados da organização mundial de saúde (WHO, *World Health Organization*) as doenças cardiovasculares são responsáveis atualmente por uma em cada três mortes no mundo. A previsão é de que essas doenças sejam responsáveis por cerca de 50% do total de mortes no mundo nos próximos dez anos (2020) (World Health Organization, 2003). No Brasil as doenças cardiovasculares são responsáveis por 27% dos casos de óbitos (Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2004). Doenças como diabetes, obesidade, elevados níveis plasmáticos de triglicérides e colesterol, e fatores ambientais como estresse, fumo e sedentarismo aumentam o risco para doenças cardiovasculares, sendo que a maioria destas doenças são resultantes de complicações provenientes da aterosclerose.

O aumento dos níveis plasmáticos de colesterol (hipercolesterolemia) representa um fator de risco independente de outras co-variáveis para o desenvolvimento de doenças ateroscleróticas. A hipercolesterolemia é geralmente controlada através da administração de estatinas, fármacos que diminuem as concentrações plasmáticas de colesterol por inibir a enzima HMG-CoA redutase, uma enzima chave na via de síntese do colesterol (Endo et al., 1976).

Apesar de bem toleradas, alguns efeitos adversos são verificados em usuários de estatinas, como danos à função hepática, aos músculos esqueléticos e aos nervos periféricos (Muscari et al., 2002).

Estudo prévio do nosso laboratório demonstrou que as estatinas causam danos mitocondriais através da indução de transição de permeabilidade mitocondrial (Velho et. al., 2005). Outros autores também verificaram efeitos mitotóxicos como a inibição dos complexos da cadeia respiratória (Sirvent et al., 2005; Nadanaciva et al., 2007; Kaufmann et al., 2006) e a ativação da via de apoptose iniciada pela mitocôndria (Sacher et al., 2005).

Nesta dissertação, estudamos o efeito da sinvastatina, uma droga da classe das estatinas, sobre o consumo de oxigênio por biopsias de músculo esquelético e de fígado. As biópsias foram colhidas de ratos tratados (experimento “*in vivo*”) ou a sinvastatina foi adicionada “*in vitro*”.

1.1 Mitocôndrias

As mitocôndrias são as organelas responsáveis pela conversão de energia de óxido-redução em energia química utilizável pelos processos celulares. Elas estão presentes em quase todas as células eucarióticas animais e vegetais, tendo dimensões da ordem de grandeza de 1 μm .

Estruturalmente são constituídas por duas membranas e dois compartimentos por elas limitados. O compartimento mais interno, delimitado pela membrana mitocondrial interna, é denominado de matriz mitocondrial e contém enzimas do ciclo de Krebs, da β -oxidação de ácidos graxos, da oxidação de aminoácidos, o complexo piruvato desidrogenase e muitas outras enzimas. O segundo compartimento, cujo volume é diminuto, é denominado espaço intermembranar por estar localizado entre as membranas interna e externa.

A membrana mitocondrial externa é permeável a pequenas moléculas e íons que se movem livremente através de canais transmembranas formados por uma família de proteínas integrais de membranas chamadas porinas (Nelson e Cox, 2004). A membrana interna é impermeável à maioria das moléculas pequenas e a íons, incluindo prótons (H^+), sendo permeável somente a O_2 , CO_2 , NO e H_2O . As únicas espécies que atravessam a membrana interna são aquelas para as quais existem transportadores específicos, como por exemplo, ATP^{-4} , ADP^{-3} , piruvato, Ca^{2+} entre outros. É na membrana interna que se encontram os componentes da cadeia respiratória e a ATP sintase.

A energia necessária para o processo de fosforilação oxidativa provém da diferença de potencial de óxido redução entre NADH e O_2 . Segundo Peter Mitchell (Mitchell, 1961) a passagem dos elétrons retirados dos substratos respiratórios pela cadeia respiratória é um processo exergônico cuja energia livre resultante é convertida em um potencial eletroquímico de H^+ através da membrana mitocondrial interna. Esta energia é utilizada pela ATP sintase para fosforilar ADP à ATP .

Normalmente, elétrons provenientes das coenzimas NADH , reduzidas durante a oxidação de carboidratos, aminoácidos e ácidos graxos, são transferidos

a NADH desidrogenase (complexo I, Figura 1). O complexo I transfere seus elétrons à forma oxidada da coenzima Q (UQ), gerando a forma reduzida desta coenzima (UQH₂). Elétrons originados a partir do succinato passam para a UQ através do complexo II, resultando também na redução da coenzima Q. Em alguns tecidos a coenzima Q pode também ser reduzida pela glicerol-3-fosfato desidrogenase (na presença de glicerol-3-fosfato citosólico) ou pela ubiquinona oxireductase (como resultado da β-oxidação de ácidos graxos). A UQH₂ é então desprotonada, resultando na formação da espécie aniônica semiquinona (UQH[•]), a forma que doa elétrons ao citocromo c. Existem dois conjuntos separados de UQH[•], um na face citoplasmática e outro na face matricial da membrana mitocondrial interna, e as duas formas de UQH[•] são oxidadas juntas, regenerando UQ e doando elétrons para o citocromo c. O citocromo c transfere elétrons à citocromo oxidase (complexo IV). Este complexo é responsável pela transferência de elétrons ao oxigênio molecular, resultando na geração de água, em um processo envolvendo quatro passos consecutivos de transferência de um elétron (Nicholls e Ferguson, 2002).

Segundo Mitchell (1961), a passagem de elétrons através da sequência de intermediários redox da cadeia respiratória permite um fluxo de H⁺ da matriz mitocondrial ao espaço intermembranas, contra um gradiente de concentração. A formação deste potencial eletroquímico transmembrânico seria o elemento inicial do acoplamento entre a oxidação de substratos e a utilização desta energia. O componente elétrico ($\Delta\psi$) deste potencial atinge valores de aproximadamente 180 mV, no estado de repouso, enquanto o componente químico (ΔpH) oscila na faixa de 0 a 1 unidade de pH. O fluxo de H⁺ através da F₀F₁-ATP sintase, de volta ao interior da mitocôndria, desta vez a favor do gradiente, estaria diretamente acoplado à produção de ATP a partir da fosforilação do ADP.

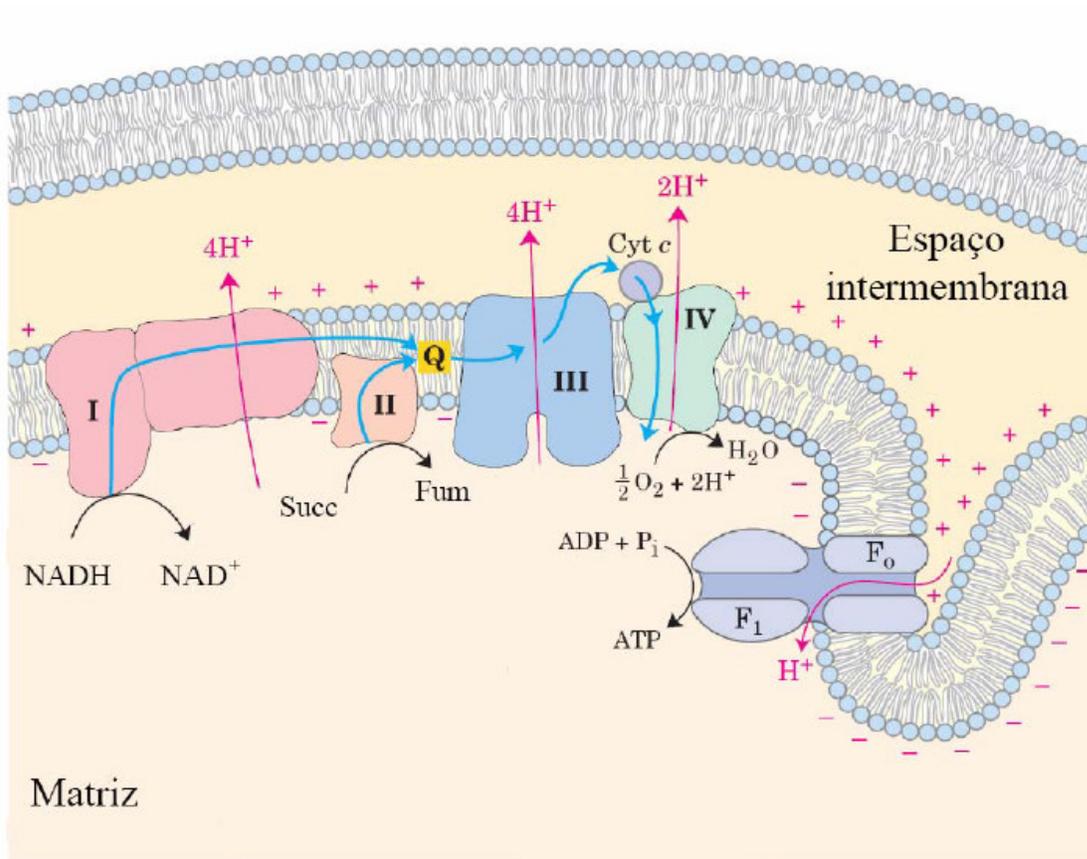


Figura 1 Esquema simplificado da cadeia respiratória e da teoria quimiosmótica aplicada à mitocôndria (Nelson e Cox, 2004, modificado). Os elétrons do NADH e de outros substratos oxidáveis passam através de uma cadeia de transportadores arranjados assimetricamente na membrana. O fluxo de elétrons é acompanhado pela transferência de prótons através da membrana mitocondrial, produzindo tanto um gradiente químico (ΔpH) quanto elétrico ($\Delta\psi$). A membrana mitocondrial interna é impermeável aos prótons, os quais podem retornar a matriz através de canais específicos de prótons (F_o) do complexo F_1F_o ATP sintase. A força próton-motora que impulsiona os prótons de volta para a matriz fornece a energia para a síntese do ATP, catalisada pelo complexo F_1 associado ao F_o .

A geração de um gradiente eletroquímico transmembrânico de prótons ($\Delta\mu\text{H}^+$) é um elemento central no aproveitamento de energia em sistemas biológicos. Evolutivamente este mecanismo é fundamental, já que é aproveitado tanto na fosforilação oxidativa em mitocôndrias quanto na fotossíntese de ATP em

cloroplastos. Além disso, este gradiente pode ser usado diretamente para processos endergônicos sem a participação de ATP. São exemplos deste mecanismo de acoplamento direto as trocas eletroforéticas de ATP^{4-} por ADP^{3-} (Klingenberg e Nelson, 1994) e a captação eletroforética de Ca^{2+} que transporta duas cargas positivas ao interior da mitocôndria (Gunter et al., 1994).

A passagem de elétrons pela cadeia respiratória tem como consequência a geração de espécies reativas de O_2 (EROs). Cerca de 2% dos elétrons que entram na cadeia respiratória não são utilizados para reduzir O_2 à H_2O . Esses elétrons "perdidos" se combinam com o oxigênio em passos intermediários da cadeia respiratória, principalmente nos complexos I e III (Turrens, 2003), promovendo a redução monoelétrica do O_2 , gerando assim o radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) (Boveris e Chance, 1973; Liu, 1997). As mitocôndrias possuem um sistema de defesa antioxidante que dismuta o $\text{O}_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 sendo que este é altamente permeável por membranas biológicas, pode ser removido por antioxidantes. O H_2O_2 pode gerar HO^{\cdot} que é altamente reativo e citotóxico, sendo que a maior parte do HO^{\cdot} gerado, *in vivo*, provém da reação descrita a seguir chamada de reação de Fenton ($\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{HO}^{\cdot} + \text{HO}^- + \text{Fe}^{3+}$) (Halliwell e Gutteridge, 1992).

As EROs geradas na mitocôndria podem oxidar macromoléculas tanto na própria organela como em outros sítios intracelulares. Proteínas, principalmente da membrana mitocondrial interna, são alvos primários de danos oxidativos induzidos por espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Esses danos envolvem a formação de grupos carbonila e a oxidação de grupos tióis. Este último pode levar a permeabilização não específica da membrana mitocondrial interna, conhecida como transição de permeabilidade mitocondrial (TPM), tornando-a gradativamente permeável a prótons, íons, suporte osmótico e pequenas proteínas de até 1500 Da (Kowaltowski et al., 2001).

1.2- Metabolismo de lipídeos, hipercolesterolemia e aterosclerose

Os lipídeos hidrofóbicos são transportados pelo sistema circulatório associados a lipídeos anfifílicos (fosfolipídios) e proteínas, formando assim as lipoproteínas plasmáticas. Já os ácidos graxos livres são transportados ligados à albumina, sendo que uma pequena parte desses compostos é transportada pelas lipoproteínas plasmáticas na forma de ésteres de colesterol. As lipoproteínas plasmáticas têm em seu núcleo ésteres de colesterol e triacilgliceróis, sendo que mais externamente são compostas de uma camada de fosfolipídios, colesterol e apolipoproteínas, que são proteínas que constituem sítios de reconhecimento que permitem a ligação das LP aos receptores celulares específicos, além de tornar as lipoproteínas mais solúveis. Existem cinco classes de lipoproteínas que diferem umas das outras quanto a composição lipídica, densidade e tipos de apolipoproteína. Em ordem decrescente de densidade, estabelecido pelo método de ultracentrifugação preparativa (Wilcox e Heimberg 1968) as LP são classificadas em: lipoproteínas de alta densidade (HDL); lipoproteínas de densidade intermediária (IDL); lipoproteínas de baixa densidade (LDL); lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL) e quilomícrons (QM).

O colesterol e triacilglicerol provenientes da dieta são absorvidos no intestino, complexados às apolipoproteínas no enterócito e secretados na linfa mesentérica na forma de quilomícrons. Os triacilgliceróis dos quilomícrons são hidrolisados pela lipoproteína lípase periférica, liberando monoglicerídeos e ácidos graxos livres, sendo que estes últimos são captados localmente, e são esterificados nos adipócitos ou oxidados nos músculos. Os remanescentes de quilomícrons possuem grandes quantidades de ésteres de colesterol e são conduzidos rapidamente ao hepatócito onde são removidos. O colesterol liberado na célula hepática pode: i) ser convertido em ácidos biliares; ii) ser secretado na bile sem sofrer alteração; iii) ou ser novamente secretado para a circulação sanguínea na forma de VLDL.

Já na via endógena, no fígado, os ácidos graxos e colesterol provenientes da síntese endógena ou da circulação, são oxidados ou esterificados em

triacilglicerol e ésteres de colesterol, respectivamente, os quais são secretados juntamente com apolipoproteínas formando as VLDL. No plasma essas lipoproteínas sofrem a ação da lipoproteína lipase periférica liberando ácidos graxos livres para os tecidos extra-hepáticos, onde serão re-esterificados e armazenados (adipócitos) ou oxidados (músculos e outros tecidos). Os remanescentes de VLDL, chamados também de IDL, são parcialmente removidos pelo hepatócito, sendo que as IDL não removidas sofrem a ação da lipoproteína lipase hepática perdendo mais triacilgliceróis e fosfolipídios, e são então denominadas LDL, ricas em ésteres de colesterol. As LDL constituem uma fonte de colesterol para a síntese de hormônios esteróides nas gônadas e adrenal, membranas plasmáticas em tecidos em proliferação e ácidos biliares no fígado. As células que tem uma maior necessidade de colesterol, expressam grandes quantidades de receptores de LDL e assim captam-na por endocitose.

As HDL são sintetizadas no intestino delgado e no fígado contendo grandes quantidades de proteínas, pouco colesterol e nenhum éster de colesterol. As HDL possuem em sua superfície a enzima lecitina-colesterol aciltransferase que a partir de fosfatidilcolina e colesterol dos remanescentes dos quilomícrons e VLDL, catalisa a formação de ésteres de colesterol que entram no interior das HDL. As HDL transportam o colesterol para ser descarregado no fígado, sendo que uma parte deste colesterol é convertida em sais biliares. As HDL podem ser captadas pelo fígado por endocitose, mas em alguns tecidos como glândula adrenal e também no próprio fígado, as HDL podem ligar-se a receptores que fazem uma transferência parcial e seletiva do colesterol da HDL para a célula, liberando assim a HDL para recircular e extrair mais lipídios. Através do transporte reverso do colesterol, o excesso deste, presente nos tecidos extra-hepáticos é transportado novamente ao fígado pela HDL. Existem duas formas, sendo que uma delas é o movimento passivo do colesterol da superfície celular diretamente para a HDL, que transporta o colesterol para o fígado. A segunda forma é através do reconhecimento da apoA-1 presente na HDL pelo receptor de células com grande quantidade de colesterol. A HDL é captada por endocitose, e em seguida,

secretada com uma quantidade maior de colesterol que será transportado até o fígado.

Embora a biossíntese de novo do colesterol ocorra em todas as células, esta capacidade é maior no fígado, no intestino, no córtex adrenal e nos tecidos reprodutores, incluindo ovários, testículos e placenta (Devlin, 2000). Além de fonte de átomos de carbono, a biossíntese de colesterol requer um considerável poder redutor. Todos os átomos de carbono do colesterol são derivados do acetato proveniente da hidrólise de ligações tioéster de alta energia da acetil CoA e de ligações fosfoanidrido do ATP, em uma série de aproximadamente trinta reações enzimáticas (Ikonen, 2006). O poder redutor citosólico na forma de NADPH é fornecido principalmente pela glicose 6-fosfato desidrogenase e 6-fosfogluconato desidrogenase, enzimas da via das pentoses, enquanto o NADPH mitocondrial é gerado principalmente pela isocitrato desidrogenase (Jo et al., 2001) e pela NAD(P) transidrogenase (Hoek et al., 1998).

Em condições fisiológicas, a síntese de novo de colesterol não é fator limitante para o funcionamento da maioria das células do corpo, mesmo na ausência de colesterol da dieta. Por outro lado, o acúmulo de colesterol intracelular é altamente citotóxico, uma vez que as células dos mamíferos não têm capacidade para degradar a molécula do colesterol. No entanto, as células desenvolveram um eficiente mecanismo homeostático de proteção contra o acúmulo de colesterol. Na vigência de aporte aumentado de colesterol, as células respondem com 3 ações contra-regulatórias que são:

- (I) O bloqueio da síntese do colesterol através da inibição dos genes das enzimas hidroximetilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) sintetase e HMG-CoA redutase sendo que esta última catalisa a etapa limitante da via de síntese do colesterol;
- (II) Inibição da transcrição do gene do receptor da lipoproteína de baixa densidade (LDL) que é o principal transportador do colesterol em seres humanos, fazendo com que a entrada do colesterol nas células fique diminuída;

- (III) Promove o aumento da esterificação do colesterol livre através do aumento da atividade da enzima acil colesterol acil transferase (ACAT), evitando uma elevação do conteúdo de colesterol nas membranas celulares (Brown e Goldstein, 1986).

Assim, na condição de aporte aumentado de colesterol na dieta, na deficiência genética de receptores de LDL ou em condições de aumento de expressão e/ou atividade da HMG-CoA redutase o colesterol acumula-se nos compartimentos extracelulares, principalmente no sangue. A hipercolesterolemia resultante é um conhecido fator de risco primário para o desenvolvimento da aterosclerose.

A aterosclerose é uma doença da parede arterial que está associada a uma progressiva perda da função de células endoteliais e o acúmulo de macrófagos sobrecarregados de colesterol (células espumosas) (Navab et al., 1995; Ross, 1999). Um processo chave na aterogênese é a modificação oxidativa de lipídeos, que estão envolvidos no recrutamento de leucócitos mononucleares para a porção íntima das artérias, um processo regulado por várias moléculas de adesão e citocinas (Puddu et al., 2005). Mitocôndrias de leucócitos ativados, bem como de células endoteliais podem produzir altas taxas de EROs, as quais podem levar a disfunção endotelial, um evento que contribui para a formação da lesão aterosclerótica (Knight-Lozano et al., 2002).

A ideia central da hipótese de oxidação (Berliner e Heinecke, 1996; Esterbauer et al., 1990) para o desenvolvimento de aterosclerose, é que EROs e espécies reativas de nitrogênio (ERNs) medeiam a modificação oxidativa de LDL e levam a formação de células espumosas (Berliner e Heinecke, 1996). Esta ideia é apoiada por estudos que demonstram a presença de LDL modificada in vivo e a habilidade que EROs e ERNs têm em converter lipoproteínas a uma forma potencialmente pró-aterogênica quando adicionados a LDL natural in vitro (Klatt e Esterbauer, 1996).

1.3 – Estatinas

Estatinas constituem uma notável classe de medicamentos redutores dos níveis plasmáticos de colesterol e têm sido associadas a uma expressiva diminuição da morbidade e mortalidade cardiovascular para pacientes em prevenção primária ou secundária da doença coronariana (Ballantyne, 1998).

As estatinas são substâncias sintéticas ou originárias da cultura de fungos, sendo a compactina a primeira estatina isolada, em 1976 por Akira Endo, que observou que o extrato de *Penicillium citrinum* tinha ação inibitória na síntese do colesterol, e posteriormente isolou o composto e denominou-o de compactina (Endo et al., 1994). A compactina revelou-se excelente inibidora da síntese do colesterol, mas por sua toxicidade, não reuniu condições de uso clínico. Posteriormente, foi isolada a lovastatina da cultura do *Aspergillus terreus*, com igual propriedade da substância anterior, mas com toxicidade muito menor. Desde então foram produzidas várias outras substâncias com fórmulas estruturais semelhantes às acima referidas como sinvastatina, lovastatina e pravastatina (**figura 2**), todas mostrando efeito inibidor da síntese do colesterol, recebendo a denominação genérica de estatinas . Sinvastatina e a lovastatina são administradas na forma lactônica (com um anel lactônico em sua estrutura) e transformadas na forma ácida ativa no plasma sanguíneo, enquanto a pravastatina é administrada diretamente na forma ácida ativa (Shitara e Sugiyama, 2006).

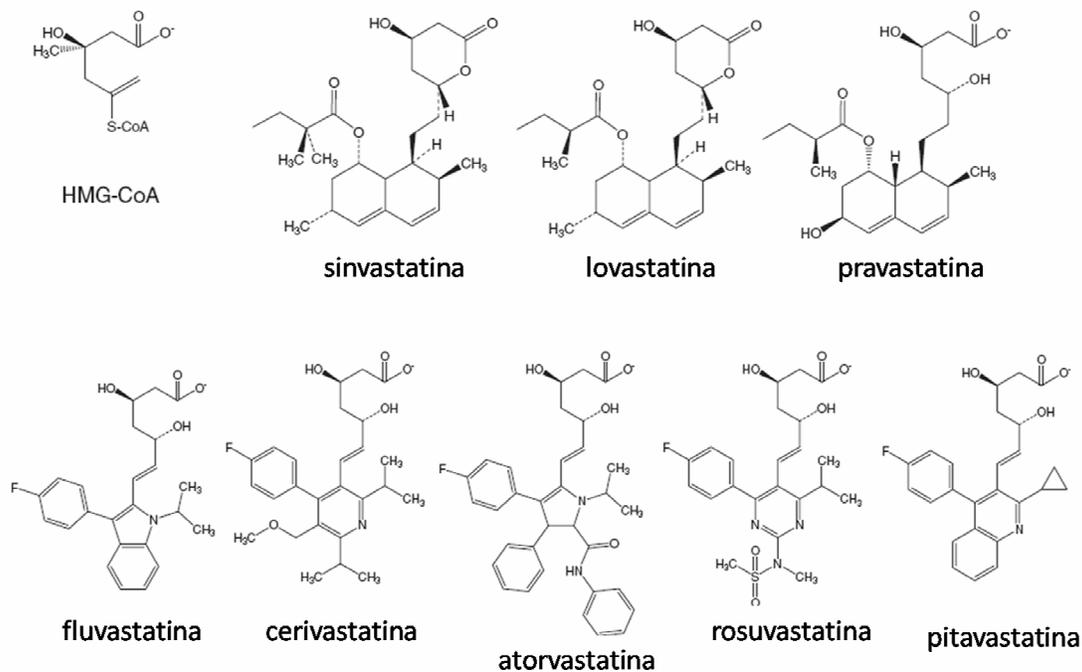


Figura 2 Estrutura química das estatinas e do HMG-CoA (Shitara e Sugiyama, 2006 modificado). Estruturas químicas do substrato da enzima HMG-CoA redutase e de diversas estatinas. Simvastatina e lovastatina são administradas em sua forma lactônica sendo transformado em sua forma ativa ácida no corpo, já as demais estatinas já são administradas nas formas ácidas que são ativas.

As estatinas são absorvidas no intestino e metabolizadas pelo citocromo P450 em células hepáticas (Shitara e Sugiyama, 2006). O mecanismo de ação das estatinas para a redução dos níveis plasmáticos de colesterol se deve a inibição da enzima HMG-CoA redutase, impedindo a transformação do HMG-CoA em ácido mevalônico, etapa chave para a síntese do colesterol. Esta inibição é reversível e competitiva com o substrato HMG-CoA (Mctaggart et al., 2001). A diminuição intracelular de colesterol estimula a síntese de receptores de LDL, o que determina uma maior captação das LDL-COL circulantes e conseqüente diminuição da concentração de COL no plasma (HOBBS et al, 1992). As estatinas

também aumentam a concentração de HDL e diminuem a concentração de TG (Maron et al., 2000).

Outros efeitos não hipolipemiantes e benéficos das estatinas, chamados de pleiotrópicos têm sido descritos. Estes incluem a melhora de disfunções em células endoteliais, ações antiinflamatórias e antiproliferativas (Futterman e Lemberg, 2004; Liao, 2002).

As estatinas são geralmente bem toleradas, porém alguns efeitos adversos são descritos, como danos à função hepática, aos músculos esqueléticos e aos nervos periféricos (Muscarì et al., 2002). Uma estatina denominada cerivastatina causou sérios casos de miotoxicidade, que resultaram em 31 mortes nos Estados Unidos da América (Staffa et al., 2002) e teve sua comercialização descontinuada pelo grande número de casos (Baker e Tarnopolsky, 2001).

1.4 – Estatinas e miopatia

A miopatia é o efeito adverso da administração de estatinas de maior incidência (7%) (Rosenson, 2004; Ucar et al., 2000). Esse efeito é dose-dependente e pode ser ou não acompanhado pelo aumento dos níveis plasmáticos de creatina quinase (Sirvent et al., 2005), uma enzima intracelular abundante em células musculares, e quando presente no compartimento plasmático, indica a ocorrência de lesão muscular. A incidência de miopatia aumenta em até cinco vezes quando estatinas são co-administradas com outros medicamentos como fibratos (Omar e Wilson, 2002), bloqueadores de canais de cálcio (Lewin et al., 2002), agentes antifúngicos (Shaukat et al., 2003), drogas antiretrovirais como os inibidores de protease (Fichtenbaum et al., 2002) e combinações destas e outras drogas. Os casos de miopatias apresentam sintomas de dores musculares, câimbras, intolerância a exercícios físicos e em casos mais raros e graves rhabdomiólise. Com a progressão da doença, mais células musculares morrem e há a liberação de grande quantidade de mioglobina

para o sangue, fato que pode comprometer a função renal e, em alguns casos evoluir para insuficiência renal e até mesmo morte.

Resultados anteriores do nosso laboratório mostraram que lovastatina induz a TPM em mitocôndrias isoladas de tecido muscular (Velho et al., 2005), evento este que pode levar a morte celular programada por apoptose ou necrose (Oliveira et al., 2008). Outros autores demonstraram ainda a inibição direta dos complexos da cadeia de transporte de elétrons em mitocôndrias isoladas e biópsias de músculo esquelético em diferentes tecidos (Sirvent et al., 2005; Nadanaciva et al., 2007; Kaufmann et al., 2006). Sacher e colaboradores mostraram a ativação da via de apoptose iniciada pela mitocôndria em células musculares humanas tratadas com estatinas (Sacher et al., 2005).

As estatinas parecem atuar também em outras organelas celulares como o retículo sarcoplasmático (Sirvent et al., 2005) podendo causar disfunções no metabolismo do cálcio (Nakahara et al., 1994; Sirvent et al., 2005; Sacher et al., 2005).

Outro mecanismo proposto na miopatia induzida por sinvastatina parece estar relacionado a inibição da síntese de ubiquinona (coenzima Q10) (Bliznakov, 2002; Rosenson, 2004), uma coenzima importante para o metabolismo celular e mitocondrial. A coenzima Q é sintetizada pela mesma via de síntese do colesterol. Dessa forma, a inibição da síntese do colesterol pelas estatinas pode conseqüentemente diminuir os níveis intracelulares de coenzima Q (**figura 3**). Kettawan e colaboradores mostraram que em ratos tratados com sinvastatina os níveis de coenzima Q10 e sua respectiva forma reduzida (H₂CoQ) estavam diminuídos em fígado, coração e em suas respectivas mitocôndrias, e no plasma sanguíneo (Kettawan et al., 2007). Em humanos usuários de estatinas também foi observada uma diminuição nos níveis de coenzima Q10 no plasma sanguíneo e em plaquetas (Bargossi et al., 1994; Young et al., 2007). Em ambos os estudos a co-administração de coenzima Q10 preveniu a sua diminuição nos diversos compartimentos estudados.

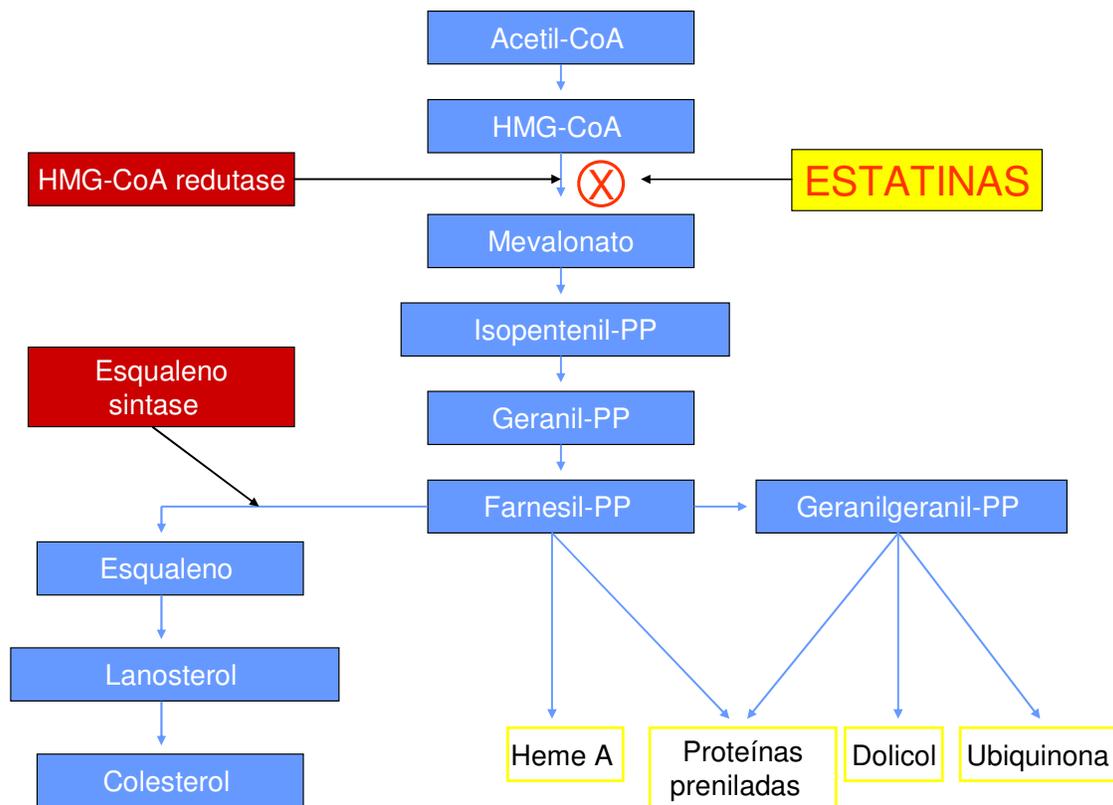


Figura 3 Via de síntese do colesterol (Sirvent et al, 2008 modificado). Inibição da enzima HMG-CoA redutase pela ação de estatinas inibe a síntese do colesterol e de outros produtos como heme A, dolicol e ubiquinona.

A coenzima Q10 é um transportador essencial na cadeia respiratória mitocondrial e tem função importante na produção energética. A relação entre diminuição de coenzima Q10 e disfunção mitocondrial é verificada pela diminuição dos níveis de coenzima Q10 paralelo a um aumento na razão lactato/piruvato no plasma sanguíneo de pacientes hipercolesterolêmicos usuários de estatinas (De Pinieux et al., 1996).

A coenzima Q10 não está distribuída somente na mitocôndria, mas também em outras frações celulares. Em sua forma reduzida (H₂CoQ) ela atua como antioxidante (Kettawan et al., 2007). A reposição de coenzima Q10 previne

contra a peroxidação lipídica em mitocôndrias de coração e fígado induzidas por sinvastatina (Kettawan et al., 2007).

Além da miotoxicidade, o tratamento com sinvastatina também causa hepatotoxicidade em 3% dos pacientes que a utilizam (Paragh e Fülöp, 2009), verificada pelo aumento dos níveis plasmáticos das enzimas alanina aminotransferase e aspartato aminotransferase (enzimas que são utilizadas como marcadores de lesão hepática) (Arduini et al., 2004). Resultados anteriores do nosso laboratório mostraram que a lovastatina induz a TPM em mitocôndrias isoladas de fígado de rato, assim como em mitocôndrias de músculo esquelético (Velho et al., 2005). Em células hepáticas (HepG2) a sinvastatina causou uma diminuição do conteúdo mitocondrial de coenzima Q10, morte celular, aumento do dano no DNA e redução da síntese de ATP (Tavintharan et al., 2007).

1.5 - L-carnitina

A L-carnitina também vem sendo utilizada no combate a miotoxicidade, especificamente nas causadas pelo uso de estatinas. Em ratos tratados com sinvastatina, a L-carnitina diminuiu os elevados níveis plasmáticos da enzima creatina quinase além de melhorar a capacidade de locomoção prejudicada (Arduini et al., 2004).

A L-carnitina é derivada da dieta (75%) e da produção endógena (25%) (Gülçin, 2005) nos rins, cérebro e fígado (Inano et al., 2003) a partir dos aminoácidos lisina e metionina (Oyanagi et al., 2008). 95% de seu estoque encontra-se nos músculos esqueléticos (Stephens et al., 2007)

A L-carnitina exerce papéis fisiológicos importantes no transporte dos ácidos graxos para a matriz mitocondrial através da membrana mitocondrial interna e também na remoção de grupamentos acil das mitocôndrias e células na forma de acilcarnitinas (Bernard et al., 2008).

Os ácidos graxos são transportados no sangue ligados à albumina (Nelson e Cox, 2004) e difundem-se para o citosol das células. Para serem

oxidados na matriz mitocondrial é necessário que eles estejam ligados a CoA. A acil-CoA sintetase liga o AG (acil) com uma coenzima A, formando assim uma acil-CoA. Após essa ativação, ocorrem alguns processos de reações enzimáticas para que esse acil-CoA seja transportado através da membrana mitocondrial interna que são descritas a seguir (figura 4):

1- A primeira reação ocorre pela atuação da enzima carnitina aciltransferase I, presente na face externa da membrana mitocondrial interna. Ela realiza a transferência do grupo acil para a carnitina, liberando a coenzima A e formando assim um acil-carnitina.

2 - O acil-carnitina ultrapassa a membrana interna e chega a matriz mitocondrial pela ação do transportador carnitina-acilcarnitina translocase, em troca de uma carnitina da matriz mitocondrial.

3 - O último passo consiste na transferência do grupo acil, da acil-carnitina, para uma coenzima A na matriz, liberando assim a carnitina. Essa reação é realizada pela enzima carnitina aciltransferase II, localizada na face interna da membrana mitocondrial interna (Noland et al., 2009).

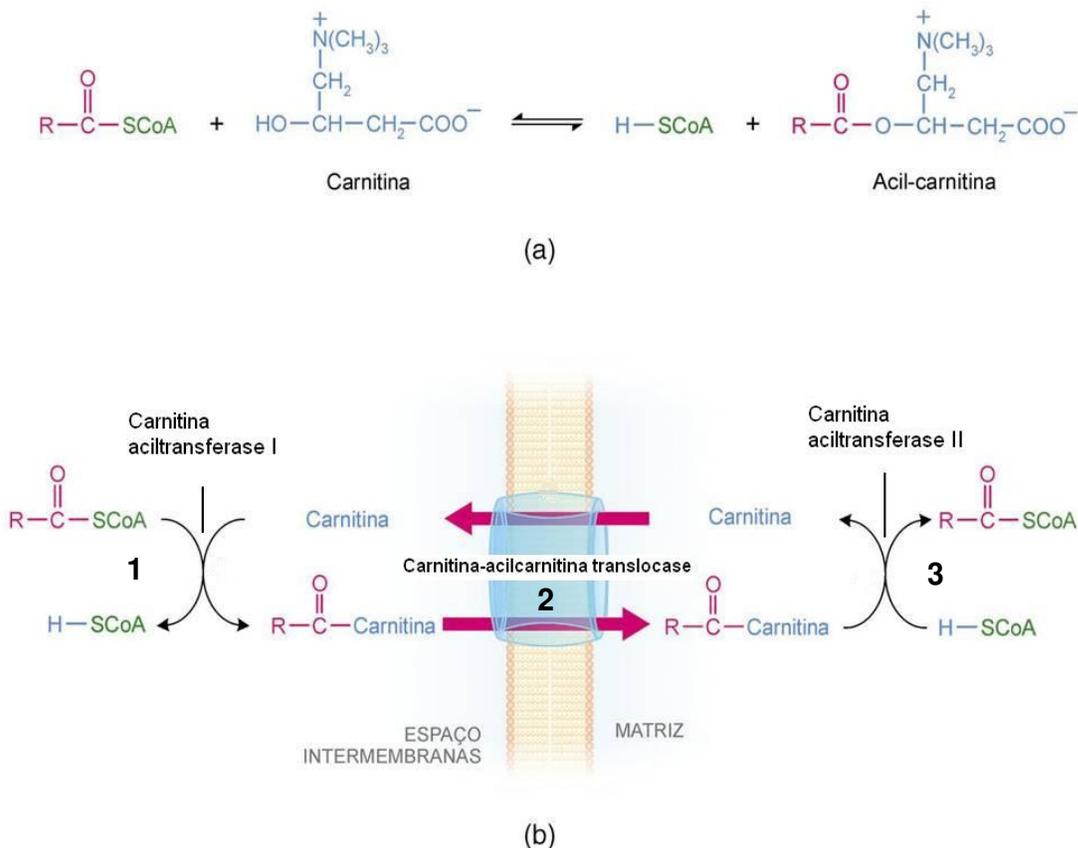


Figura 4 Transporte de ácidos graxos de cadeia longa para a matriz mitocondrial (Marzzoco e Torres, 2007 modificado). (a) transferência do grupamento acil da coenzima A para a carnitina, formando assim um acil-carnitina e liberando a coenzima A (b) (1) o grupamento acil da acil-CoA é transferido para uma carnitina pela enzima carnitina aciltransferase I, liberando assim a coenzima A, em seguida (2) esse composto passa pela membrana interna mitocondrial pelo transportador carnitina-acilcarnitina translocase enquanto uma carnitina é transportada para o espaço intermembranas e (3) já na matriz liga-se novamente a uma coenzima A liberando a carnitina pela ação da enzima carnitina aciltransferase II.

Na matriz mitocondrial as acil-CoA passam por uma série de remoções oxidativas de sucessivas unidades de dois átomos de carbonos na forma de acetil-CoA, começando pela extremidade carboxila da cadeia do ácido graxo, até o último par estar na forma de acetil-CoA. Essas remoções são realizadas em quatro passos, sendo que em dois deles há oxidação do ácido graxo. Os passos

são: oxidação, hidratação, outra oxidação e por fim uma reação que rompe o fragmento carboxiterminal de dois átomos de carbono do ácido graxo original na forma de acetil-CoA. Esses quatro passos são repetidos em cada uma das passagens da quebra dos dois átomos de carbono do ácido graxo (Rector e Ibdah, 2009).

A oxidação dos ácidos graxos forma várias coenzimas reduzidas (NADH e FADH₂) e várias moléculas de acetil-CoA que são oxidados até CO₂ pelo ciclo de Krebs formando mais coenzimas reduzidas. Estas serão utilizadas no processo de fosforilação oxidativa descrito anteriormente.

A L-carnitina exerce outros papéis de fundamental importância além dos papéis fisiológicos descritos anteriormente. Alguns estudos demonstram que a L-carnitina atua como protetor mitocondrial em vários tecidos (Virmani et al., 1995; Furuno et al., 2000; Nishimura et al., 2008; Oyanagi et al., 2008). Em células neuronais de fetos de ratos foi demonstrado que a L-carnitina mantém a viabilidade celular diante dos compostos mitotóxicos: rotenona, FCCP e ácido nitropropiónico (inibidor do complexo II da cadeia respiratória) (Virmani et al., 1995). Em mitocôndrias isoladas de fígado de rato a L-carnitina protegeu contra a TPM induzida por palmitoil-CoA (Furuno et al., 2001) ou ácido oléico (Oyanagi et al., 2008). Nesse caso, a ação protetora da L-carnitina foi direcionar estes AG para a β -oxidação, reduzindo seus efeitos deletérios nas membranas mitocondriais. Em um trabalho publicado por Gülçin em 2005, foi demonstrado que a L-carnitina também atua como antioxidante, tendo a capacidade de seqüestrar os radicais ânion superóxido e peróxido de hidrogênio e de quelar ferro (Gülçin, 2005).

2 - OBJETIVOS

2.1 – Objetivo geral

Estatinas são fármacos utilizados com relativa segurança e tolerabilidade, mas efeitos colaterais como miotoxicidade e hepatotoxicidade tem sido relatados. Esses efeitos tem sido associados a disfunções mitocondriais como inibição da respiração (Sirvent et al., 2005; Kaufmann et al., 2006) e abertura do poro de transição de permeabilidade (Velho et al., 2005).

A L-carnitina é um composto que pode atuar auxiliando no combate aos efeitos miotóxicos induzidos por sinvastatina em ratos tratados com esse fármaco (Arduini et al., 2004) e protege as mitocôndrias contra os efeitos de vários xenobióticos (Virmani et al., 2003; Gülçin, 2005; Oyanagi et al., 2008).

Assim, o objetivo geral deste trabalho foi estudar os mecanismos de ação da sinvastatina sobre a bioenergética mitocondrial em biópsias de músculo esquelético e de fígado de rato.

2.2 – Objetivos específicos

- Realizar estudos de dose-efeito de sinvastatina sobre as velocidades de respiração de biópsias de músculo esquelético e de fígado.

- Analisar os mecanismos pelos quais ocorrem mudanças nas velocidades de respiração destas biópsias.

- Analisar se L-carnitina tem efeito protetor “*in vitro*” nas eventuais mudanças de velocidades de respiração nessas biópsias.

- Analisar os efeitos do tratamento “*in vivo*” com sinvastatina nas velocidades de respiração de biópsias musculares destes animais e a possível proteção contra esses efeitos.

3 – MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Reagentes

Sinvastatina foi adquirida da Galena Química e Farmacêutica Ltda (SP, Brasil). Todos os outros reagentes utilizados nos experimentos foram adquiridos de Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA) ou Cultilab (Campinas, Brasil).

3.2 - Animais

Foram utilizados nos experimentos ratos Wistar fêmeas provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) /UNICAMP.

Os ratos utilizados tinham 6-8 semanas e foram mantidos e criados em sala climatizada em $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ com ciclo claro-escuro de 12 horas no Biotério do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental (NMCE) / UNICAMP.

Os ratos tiveram acesso à dieta padrão (Nuvital CR1, PR, Brasil) e água filtrada a vontade.

3.3 - Tratamento com Sinvastatina e L-carnitina

Sinvastatina, L-carnitina, sinvastatina com L-carnitina ou placebo (goma arábica 2 %, veículo para as duas drogas) foram administrados diariamente através de gavagem oral, na dose de 100 mg/kg de peso corporal para a sinvastatina e 200 mg/kg de peso corporal (Arduini et al., 2004) para L-carnitina, por um período de 15 dias.

3.4 - Preparação das biópsias de músculo esquelético

Músculo esquelético sóleo de ratos Wistar foi retirado e mantido em um meio de conservação de biópsias padrão contendo tampão Ca^{2+} /EGTA 10

mmol/L, imidazol 20 mmol/L, MES 50 mmol/L, dithiothreitol 0.5 mmol/L, $MgCl_2$ 7 mmol/L, ATP 5 mmol/L, fosfocreatina 15 mmol/L, com o pH ajustado em 7.1, e sendo mantido no gelo.

Em seguida 2-3 mg de tecido são retirados e, com o auxílio de duas pinças, as fibras desse tecido são separadas, secadas em papel filtro e pesadas. Após a obtenção do peso elas são colocadas no meio de conservação de biópsias acrescido de saponina 50 $\mu g/ml$ por 30 minutos com uma leve agitação. A ação da saponina é descrita na figura 5.

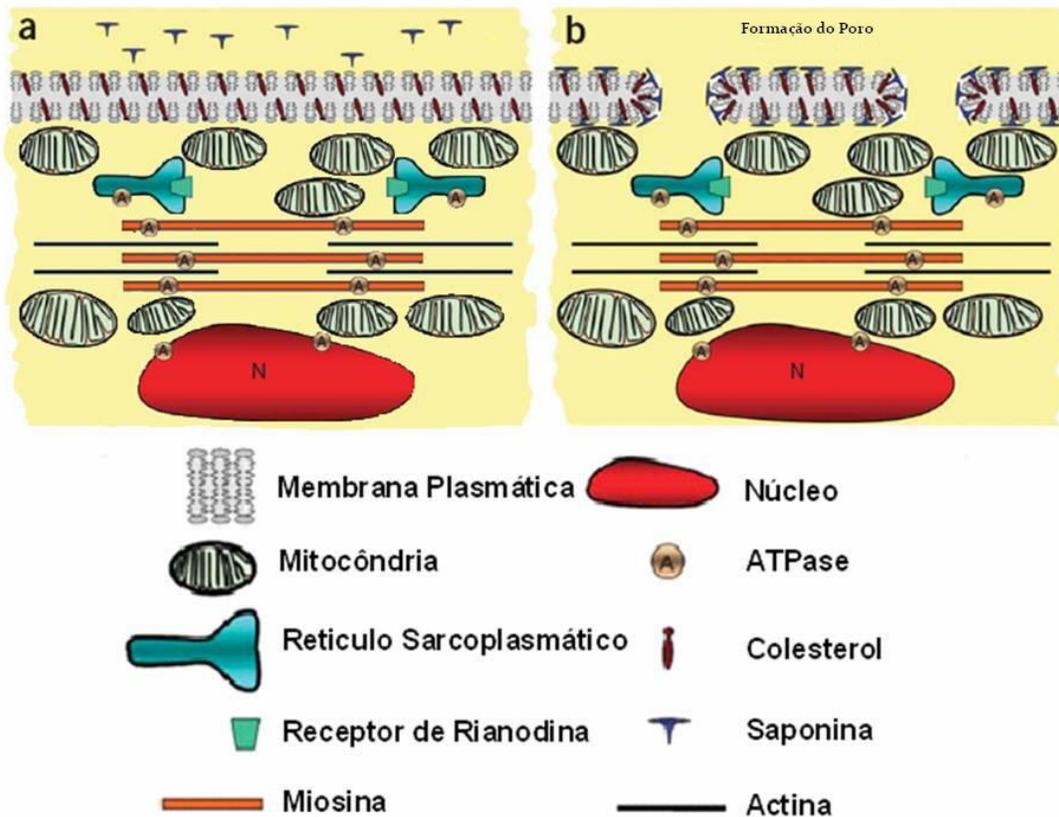


Figura 5 Permeabilização por ação de saponina nas membranas plasmáticas de biópsias de músculo esquelético. Saponina atua somente na membrana plasmática das biópsias, mantendo as organelas em perfeito estado, devido à concentração de colesterol por fosfolípidios nas membranas. Na membrana plasmática existe 0,5 mol de colesterol por mol de fosfolípido, enquanto nas membranas mitocondriais internas e externas esses valores são respectivamente 0,01 e 0,07 mol de colesterol por mol de fosfolípido (Kuznetsov, 2008, modificado).

Após a permeabilização esse tecido é lavado por 3 vezes no meio de incubação (MiR05) para retirar a saponina do tecido.

3.5 - Preparação das biópsias de fígado

O fígado é retirado e colocado em um cortador automático de precisão para que cortes homogêneos sejam feitos e em seguida são colocados e mantido em meio de conservação igual ao utilizado em biópsias musculares a 4 °C. As biópsias são separadas levemente com auxílio de duas pinças, secadas em papel filtro e pesadas, estando assim, preparadas para o experimento.

3.6 - Isolamento de mitocôndrias de músculo de ratos

Mitocôndrias de músculo foram isoladas a partir de músculo esquelético dos ratos.

Após a dissecação do animal, os músculos foram picados e homogeneizados em solução contendo sacarose 100 mM, K_2HPO_4 1 mM, EGTA 0,5 mM, BSA 0,2 %, KCl 100mM e tampão Tris-HCl 5 mM, pH 7,4, seguido por uma serie centrifugações diferenciais (Tonkonogi e Salhin, 1997). A fração mitocondrial final foi ressuspensa em solução de manitol 0,2 M, sacarose 0,1 M e Tris-HCl 5 mM, ph 7,4.

3.7 - Dosagem de proteína

A concentração de proteína das suspensões mitocondriais foi determinada pelo método de biureto (Gornall et al., 1949), modificado pela adição de colato 1 % (Kaplan e Pedersen, 1983). O principio do método baseia-se na determinação da concentração de ligações peptídicas através da medida da absorbância do complexo cobre-nitrogênio. Este complexo absorve em comprimento de onda 540 nm. A absorbância foi considerada diretamente proporcional à concentração de proteína na solução analisada, onde uma solução de BSA a 1 % foi utilizada como padrão.

3.8 - Condições experimentais

Os experimentos com biópsias e mitocôndrias isoladas de músculo de ratos foram realizados a 37 °C em meio de reação MiR05 (MiR05; Oroboros, Innsbruck, Austria) contendo lactobionato de potássio 60 mmol/L, EGTA 0.5 mmol/L, MgCl₂ 3 mmol/L, taurina 20 mmol/L, KH₂PO₄ 10 mmol/L, HEPES 20 mmol/L, sacarose 110 mmol/L, BSA 1 g/L, com pH ajustado em 7,1.

Como substrato respiratório foram utilizados glutamato 10 mM e malato 5 mM. Outros reagentes adicionados foram indicados nas figuras.

Os experimentos tiveram a duração máxima de 1 hora e 50 minutos.'

3.9 - Consumo de oxigênio de biópsias e mitocôndrias isoladas

O consumo de oxigênio das biópsias e mitocôndrias isoladas foi medido utilizando-se um oxígrafo de grande resolução OROBOROS (Innsbruck, Áustria) equipado com agitador magnético, e os dados reproduzidos e calculados pelo software específico do aparelho. São utilizados 2 ml de meio MiR05 com agitação constante.

3.10 - Dosagem da produção de lactato em biópsias de músculo esquelético

A dosagem foi realizada por um método fluorimétrico. Biópsias de músculo sóleo foram retiradas e mantidas em meio de conservação padrão a 4 °C. Em seguida, com o auxílio de duas pinças, as fibras desse tecido são separadas e o tecido é incubado em meio Mir05, por 1 hora, na presença de 10mM de glutamato, 5 mM de malato, 1µM de sinvastatina ou DMSO e ainda 100 µM de mevalonato ou 10 µM de coenzima Q10 ou 1 mM de L-carnitina. Após 1 hora, retiramos uma alíquota deste meio e adicionamos a um meio contendo hidroxilamina 50 mM, tris

50 mM, NAD⁺ 800 μM, lactato desidrogenase 40 U, com pH = 10 e na temperatura de 25 °C.

As concentrações de lactato no meio de reação foram acompanhadas em um espectrofluorímetro Hitachi F-4500 operando nos comprimentos de onda de excitação e emissão de 366 e 450 nm, respectivamente, com a largura da fenda de 5 nm. A concentração de lactato foi calculada em função do aumento de fluorescência relativa a formação de NADH das amostras. Calibrações foram realizadas por meio da adição de concentrações conhecidas de lactato.

As biópsias utilizadas foram homogeneizadas e em seguida foi realizada a dosagem protéica pelo método de Biureto modificado, descrito anteriormente, para a normalização dos resultados.

3.11 - Análises estatísticas

Os dados são apresentados como média ± epm. O n se refere ao número de animais utilizados em cada experimento. As análises estatísticas foram feitas usando one-way ANOVA para comparações múltiplas, seguida pelo pós teste de Turkey e teste *t* de *Student* para comparação de médias, usando o programa Origin 7.5. $p < 0.05$ foi considerado significativo.

4 – RESULTADOS

Inibição, por sinvastatina, da respiração de biópsias de músculo esquelético: prevenção por mevalonato, coenzima Q10 ou L-carnitina.

Com o objetivo de investigar os efeitos da sinvastatina sobre a respiração mitocondrial de músculo esquelético *“in vitro”*, incubamos biópsias permeabilizadas de músculo esquelético sóleo durante 1 hora na presença de doses crescentes (1 a 40 μM) de sinvastatina. Nessas condições, monitoramos o consumo de oxigênio dessas biópsias nos estados de fosforilação (adição de ADP), repouso (adição de oligomicina) e desacoplada (adição de FCCP).

A figura 6 mostra que sinvastatina causa inibição das velocidades de respiração estimuladas por ADP ou FCCP em relação ao controle (DMSO) de maneira dose-dependente, sem haver efeito nas velocidades de respiração de repouso. Na concentração de 1 μM a sinvastatina reduziu em cerca de 25 % a respiração estimulada por ADP e em 27 % a respiração estimulada por FCCP. Na presença de 40 μM de sinvastatina a inibição foi de cerca de 57 % quando estimulada por ADP ou FCCP.

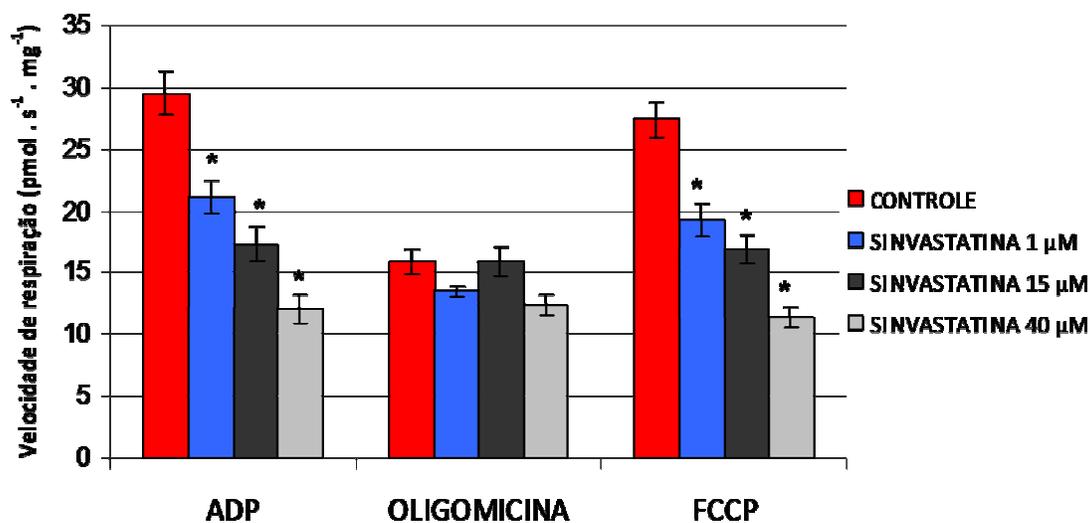


Figura 6 Efeito de concentrações crescentes de sinvastatina sobre a velocidade de respiração mitocondrial em biópsias de músculo sóleo de ratos Wistar. Biópsias de 2-3 mg foram adicionadas ao meio MiR05 padrão. Foi adicionado DMSO ou sinvastatina 1, 15 e 40 μM. Após 1 hora, ADP 400 μM, oligomicina 1 μg/ml e FCCP 0,2 μM foram adicionados. n = no mínimo 5 experimentos independentes, * estatisticamente diferente do controle (p < 0,05).

A sinvastatina é um fármaco que reduz os níveis circulantes de colesterol por inibir a enzima HMG-CoA redutase, impedindo a formação de mevalonato. Para checarmos se o efeito de inibição da respiração pela sinvastatina foi dependente da inibição da síntese de mevalonato, incubamos as biópsias na presença de 1 μM de sinvastatina e 100 μM de mevalonato. A figura 7 mostra que 100 μM de mevalonato, preveniu parcialmente o efeito de 1μM de sinvastatina sobre a respiração mitocondrial estimulada por ADP ou FCCP.

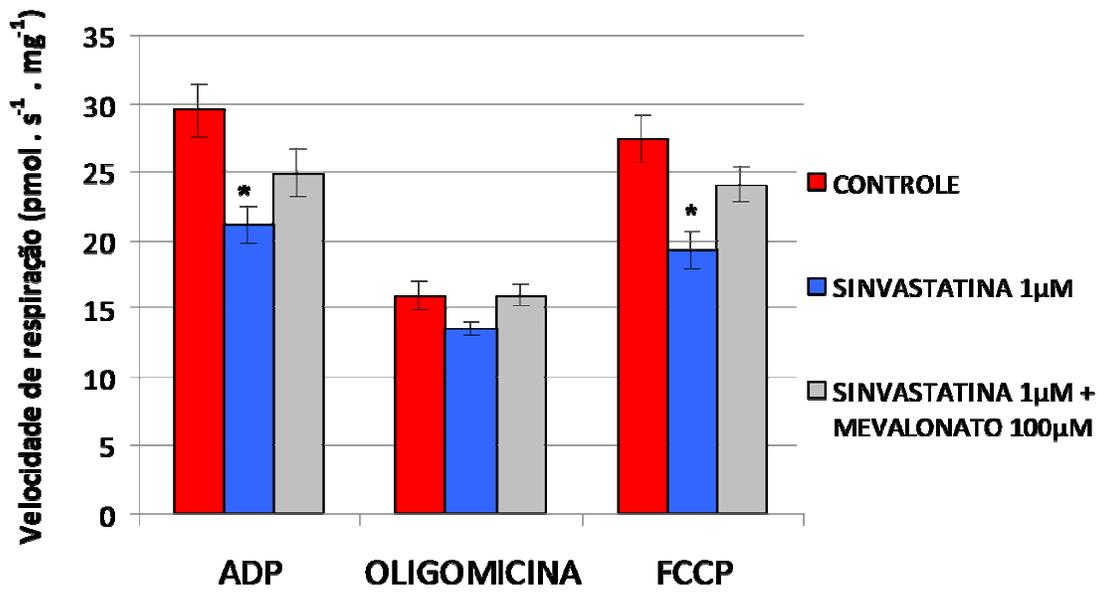


Figura 7 Velocidades de respiração mitocondrial em biópsias musculares na presença de sinvastatina e mevalonato. Biópsias de 2-3 mg foram adicionadas ao meio MiR05 padrão com a adição de mevalonato 100 µM. Foi adicionado sinvastatina 1 µM e após 1 hora ADP 400 µM, oligomicina 1 µg/ml e FCCP 0,2 µM. n = no mínimo 5 experimentos independentes, * estatisticamente diferente do controle ($p < 0,05$).

A proteção parcial por mevalonato indicou que a inibição da respiração mitocondrial em biópsias musculares pudesse ser consequência da inibição da geração de coenzima Q10, cuja biossíntese ocorre pela mesma via do colesterol.

A figura 8 mostra que 10 µM de coenzima Q10 preveniu significativamente o efeito de 1 µM de sinvastatina sobre a respiração mitocondrial estimulada por ADP ou FCCP.

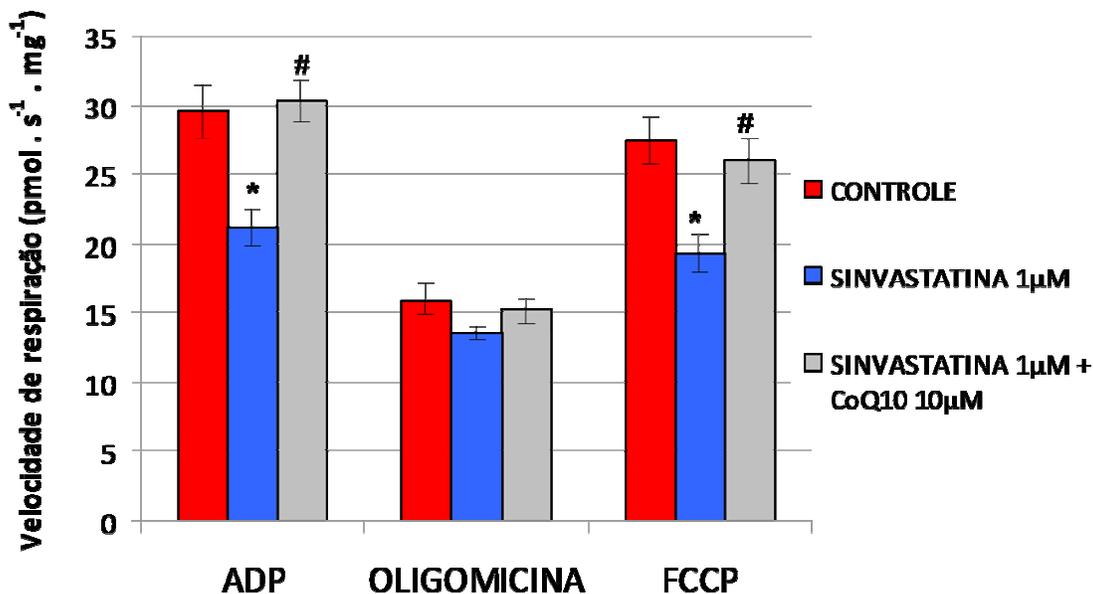


Figura 8 Velocidades de respiração mitocondrial em biópsias musculares na presença de sinvastatina e co-enzima Q10. Biópsias de 2-3 mg foram adicionadas ao meio MiR05 padrão com a adição de coenzima Q10 10 µM. Foi adicionado sinvastatina 1 µM e após 1 hora ADP 400 µM, oligomicina 1 µg/ml e FCCP 0,2 µM. n = no mínimo 5 experimentos independentes, * estatisticamente diferente do controle ($p < 0,05$), # estatisticamente diferente de sinvastatina 1 µM $p < 0,05$.

Como a L-carnitina é um composto que auxilia no combate aos efeitos miotóxicos induzidos por sinvastatina, em ratos tratados com esse fármaco (Arduini et al., 2004), e protege as mitocôndrias contra os efeitos de vários xenobióticos (Oyanagi et al., 2008; Virmani et al., 2003; Gülçin, 2005) testamos o efeito desse composto sobre a respiração mitocondrial de biópsias de sóleo na presença de 1 µM sinvastatina. A figura 9 mostra que 1 mM de L-carnitina protegeu de forma significativa o efeito de 1µM de sinvastatina sobre a respiração mitocondrial estimulada por ADP ou FCCP.

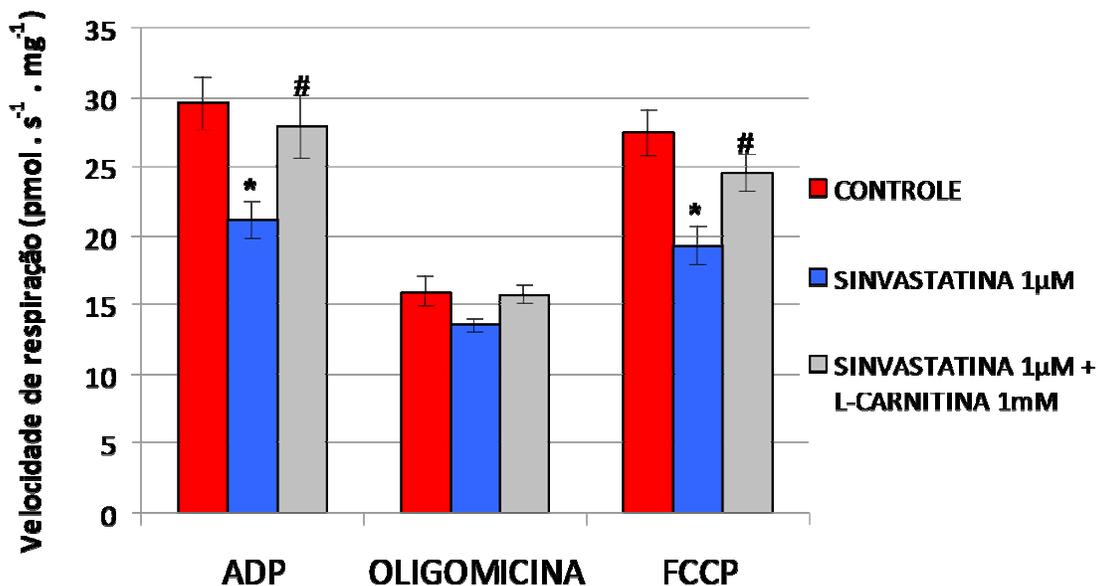


Figura 9 Velocidades de respiração mitocondrial em biópsias musculares na presença de sinvastatina e L-carnitina. Biópsias de 2-3 mg foram adicionadas ao meio MiR05 padrão com a adição de L-carnitina 1 mM. Foi adicionado sinvastatina 1 µM e após 1 hora ADP 400 µM, oligomicina 1 µg/ml e FCCP 0,2 µM. n = no mínimo 5 experimentos independentes, * estatisticamente diferente do controle ($p < 0,05$), # estatisticamente diferente de sinvastatina 1 µM ($p < 0,05$).

Efeitos do tratamento “*in vitro*” com sinvastatina sobre a velocidade de respiração de mitocôndrias isoladas de músculo de ratas Wistar

Com o objetivo de investigar se o efeito da incubação com 1 µM de sinvastatina tem uma atuação direta nas mitocôndrias, testamos o efeito deste fármaco em mitocôndrias isoladas de músculo esquelético. A figura 10 mostra que 1 µM de sinvastatina não causou nenhum efeito nas velocidades de respiração de mitocôndrias isoladas de músculo esquelético, quando incubadas por 1 hora.

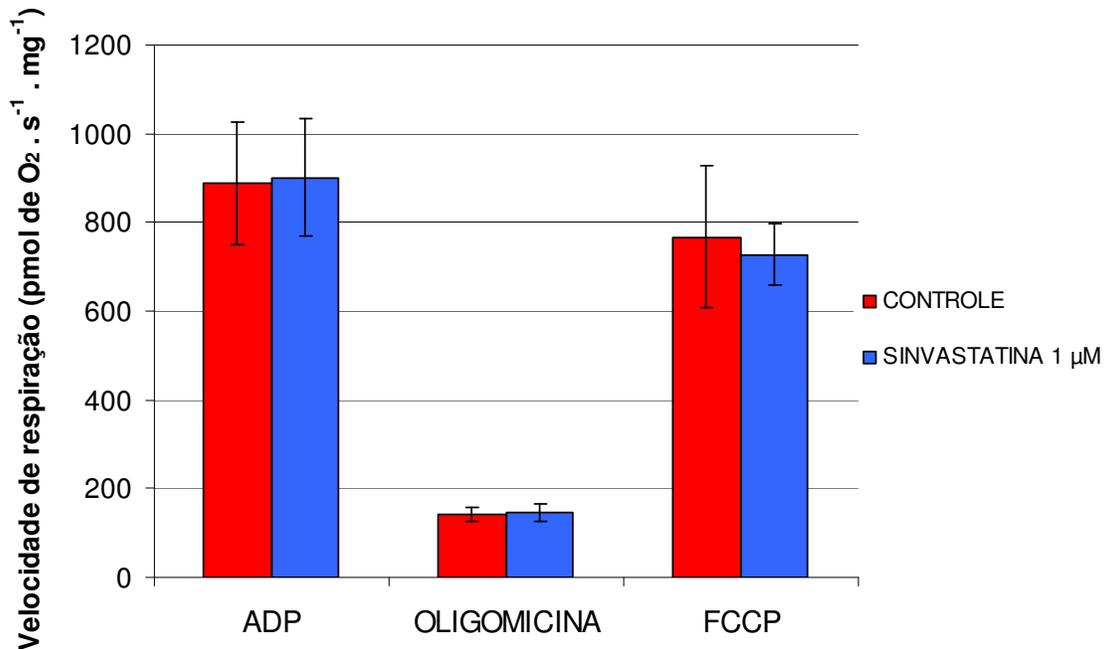


Figura 10 Velocidades de respiração de mitocôndrias isoladas de músculo esquelético na presença de DMSO e sinvastatina. Mitocôndrias (0,1 mg/ml) foram adicionadas ao meio MiR05 padrão. Foi adicionado DMSO ou sinvastatina 1 μM e após 1 hora ADP 400 μM, oligomicina 1 μg/ml e FCCP 0,6 μM. n = 3 experimentos independentes.

Efeitos do tratamento “*in vitro*” com sinvastatina sobre a produção de lactato de músculo esqueléticos de ratos Wistar

De Pinieux et al. verificaram que, em pacientes hipercolesterolêmicos, a razão lactato/piruvato sanguínea estava aumentada, indicando assim a ocorrência de disfunção mitocondrial (De Pinieux et al., 1996). Com o objetivo de investigar se neste modelo “*in vitro*” havia uma modificação na produção de lactato, incubamos biópsias de músculo esquelético durante 1 hora na presença de DMSO, 1 μM de sinvastatina, 1 μM de sinvastatina com 100 μM de mevalonato, 1 μM de sinvastatina com 10 μM de coenzima Q10 ou 1 μM de sinvastatina com 1 mM de L-carnitina. A figura 11 mostra que biópsias de músculo esquelético

submetidas ao tratamento com 1 μM de sinvastatina apresentaram uma maior produção de lactato, sendo que esta produção é prevenida pela presença de (A) mevalonato, (B) coenzima Q10 ou (C) L-carnitina.

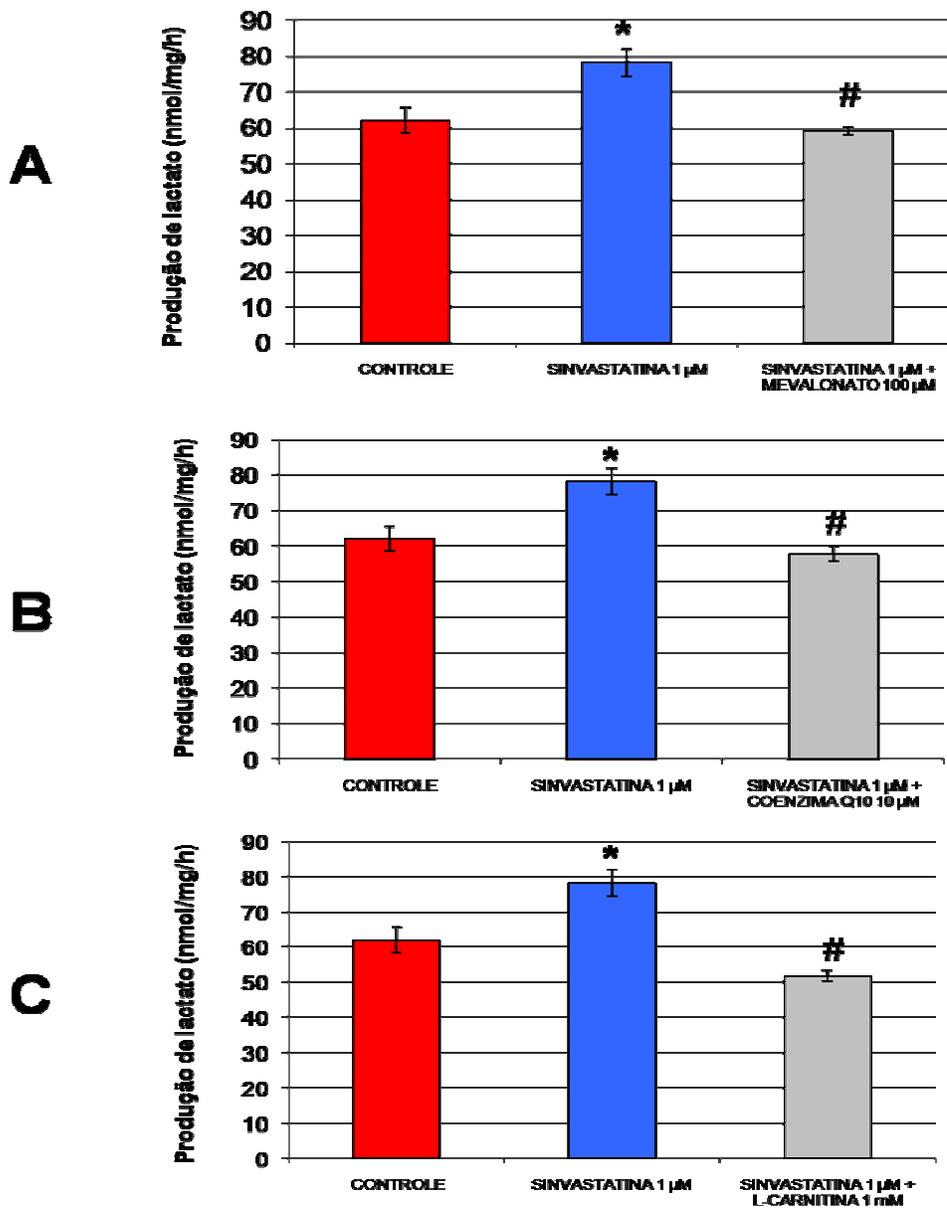


Figura 11 Produção de lactato em biópsias musculares tratadas com sinvastatina. Biópsias musculares foram adicionadas ao meio MiR05 padrão na presença de DMSO ou sinvastatina durante 1 hora. As fibras foram tratadas também com sinvastatina durante 1 hora, recebendo um tratamento prévio com mevalonato, coenzima Q10 ou L-carnitina. Após isso, foi adicionado ao meio padrão para dosagem de lactato, 40 U da enzima lactato desidrogenase, 50 mM de NAD⁺ e uma alíquota do meio em que a biópsia permaneceu encubada. n = no mínimo 4 experimentos independentes, * estatisticamente diferente do controle ($p < 0,05$), # estatisticamente diferente de sinvastatina 1 μ M ($p < 0,05$).

Inibição, por sinvastatina, da respiração de biópsias de fígado: mevalonato, coenzima Q10 ou L-carnitina não previnem essa inibição.

Além da miotoxicidade, o tratamento com sinvastatina também causa outro efeito colateral aos pacientes que a utilizam, que é a hepatotoxicidade, verificado pelo aumento dos níveis plasmáticos das enzimas alanina aminotransferase e aspartato aminotransferase (enzimas que são utilizadas como marcadores de lesão hepática) (Arduini et al., 2004; GHIRLANDA et al., 1993). Investigamos aqui os efeitos de sinvastatina sobre a respiração mitocondrial em biópsias de fígado de ratos. Assim como verificado em biópsias de músculo esquelético, a incubação por 1 hora de biópsias de fígado com sinvastatina causou inibição das velocidades de respiração estimuladas por ADP ou FCCP de maneira dose-dependente em relação ao controle (DMSO), sem promover alteração na velocidade de respiração de repouso (adição de oligomicina) (figura 12). Na concentração de 5 μM , a sinvastatina reduziu em cerca de 21 % a respiração estimulada por ADP e em 20 % a respiração estimulada por FCCP. No entanto, 1 μM de sinvastatina não alterou as velocidades estimuladas por ADP ou FCCP nessas biópsias assim como ocorrido em músculo esquelético.

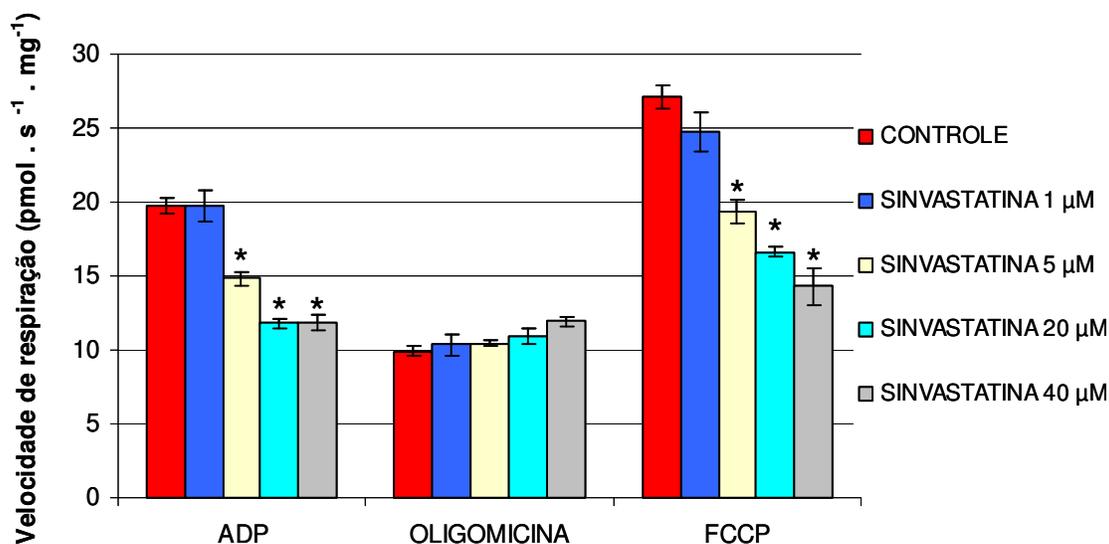


Figura 12 Velocidades de respiração mitocondrial em biópsias de fígado na presença de sinvastatina. Biópsias de 2-3 mg foram adicionadas ao meio MiR05 padrão. Foi adicionado dmsou ou sinvastatina 1, 5, 20 ou 40 μM. Após 1 hora, ADP 400 μM, oligomicina 1 μmg/ml e FCCP 1,5 μM foram adicionados. n = no mínimo 3 experimentos independentes, * estatisticamente diferente do controle (p < 0,05).

As inibições causadas por 1 μM de sinvastatina em biópsias de músculo esquelético, são revertidas pela ação de 100 μM de mevalonato. Assim como em biópsias de músculo esquelético, testamos se a toxicidade causada por sinvastatina era resultado da inibição da HMG-CoA redutase. A figura 13 mostra que a presença de 100 μM de mevalonato não preveniu a inibição por sinvastatina 5 μM da respiração estimulada por ADP e FCCP em biópsias de fígado.

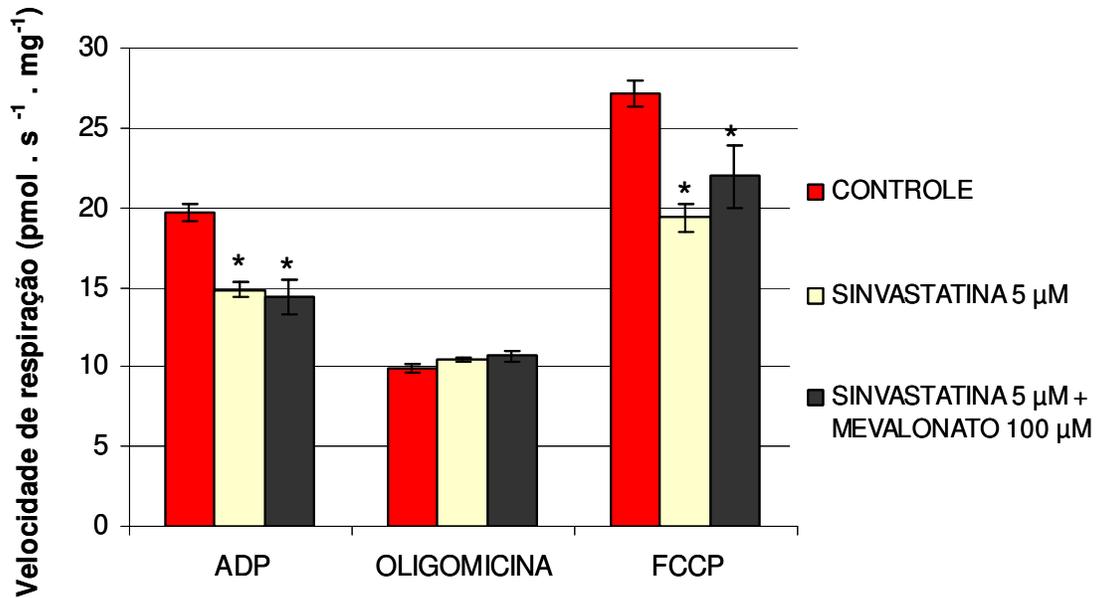


Figura 13 Velocidades de respiração mitocondrial em biópsias de fígado na presença de sinvastatina e mevalonato. Biópsias de 2-3 mg foram adicionadas ao meio MiR05 padrão com a adição de mevalonato 100 μM. Foi adicionado sinvastatina 5 μM e após 1 hora ADP 400 μM, oligomicina 1 μg/ml e FCCP 1,5 μM. n = no mínimo 5 experimentos independentes, * estatisticamente diferente do controle (p < 0,05).

Assim como o mevalonato, 10 μM de coenzima Q10 não exerceu proteção sobre a inibição causada por 5 μM de sinvastatina na respiração estimulada por ADP ou FCCP em biópsias de fígado (figura 14).

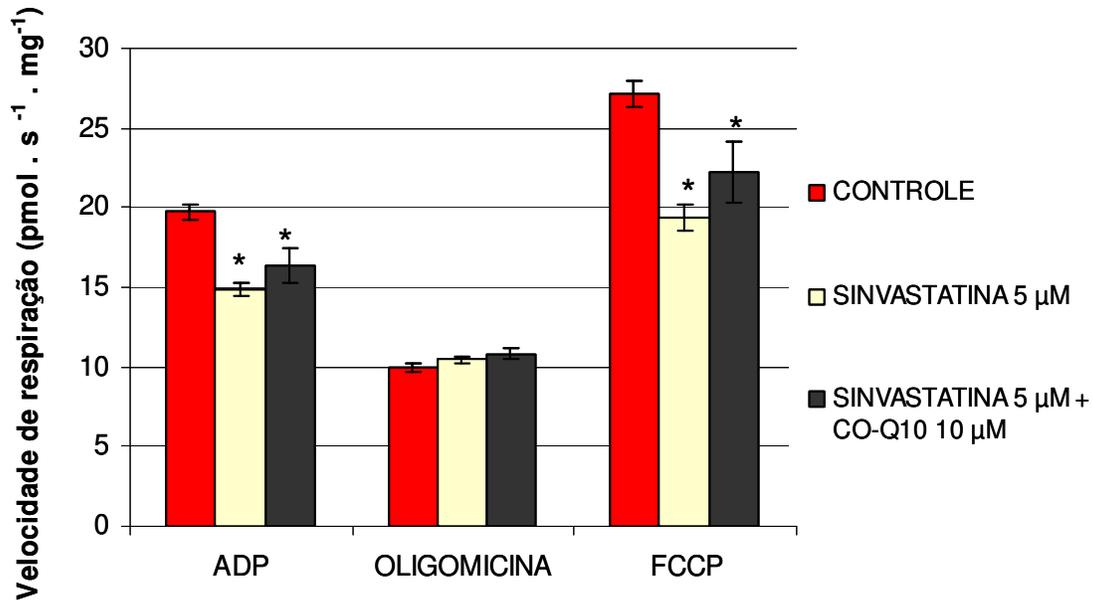


Figura 14 Velocidades de respiração mitocondrial em biópsias de fígado na presença de sinvastatina e coenzima Q10. Biópsias de 2-3 mg foram adicionadas ao meio MiR05 padrão com a adição de coenzima Q10 10 μ M. Foi adicionado sinvastatina 5 μ M e após 1 hora ADP 400 μ M, oligomicina 1 μ g/ml e FCCP 1,5 μ M. n = no mínimo 5 experimentos independentes, * estatisticamente diferente do controle ($p < 0,05$).

Investigamos também se a L-carnitina teria algum efeito protetor sobre a ação da sinvastatina em biópsias de fígado, como ocorrido em biópsias de músculo esquelético.

A figura 15 mostra que 1 mM de L-carnitina não possui ação protetora em biópsias de fígado contra a inibição causada por 5 μ M de sinvastatina na respiração estimulada por ADP ou FCCP em biópsias de fígado.

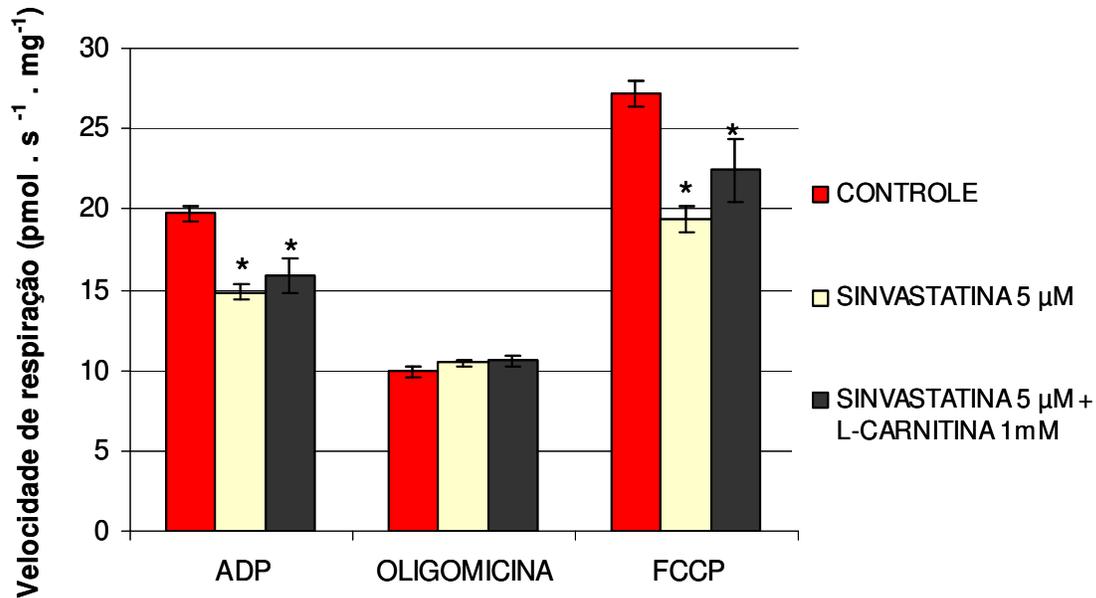


Figura 15 Velocidades de respiração mitocondrial em biópsias de fígado na presença de sinvastatina e L-carnitina. Biópsias de 2-3 mg foram adicionadas ao meio MiR05 padrão com a adição de L-carnitina 1 mM. Foi adicionado sinvastatina 5 μM e após 1 hora ADP 400 μM, oligomicina 1 μg/ml e FCCP 1,5 μM. n = no mínimo 5 experimentos independentes, * estatisticamente diferente do controle (p < 0,05).

Efeitos do tratamento “*in vivo*” com sinvastatina sobre a respiração de biópsias de músculo esquelético de ratos Wistar

A figura 16 mostra que biópsias de músculo esquelético sóleo de ratos submetidos a tratamento durante 15 dias com 100 mg/kg de sinvastatina, apresentam diminuição significativa nas velocidades de respiração mitocondrial de fosforilação (ADP), de repouso (oligomicina) e desacoplada (FCCP). O tratamento simultâneo com L-carnitina 200mg/kg preveniu significativamente o efeito da sinvastatina.

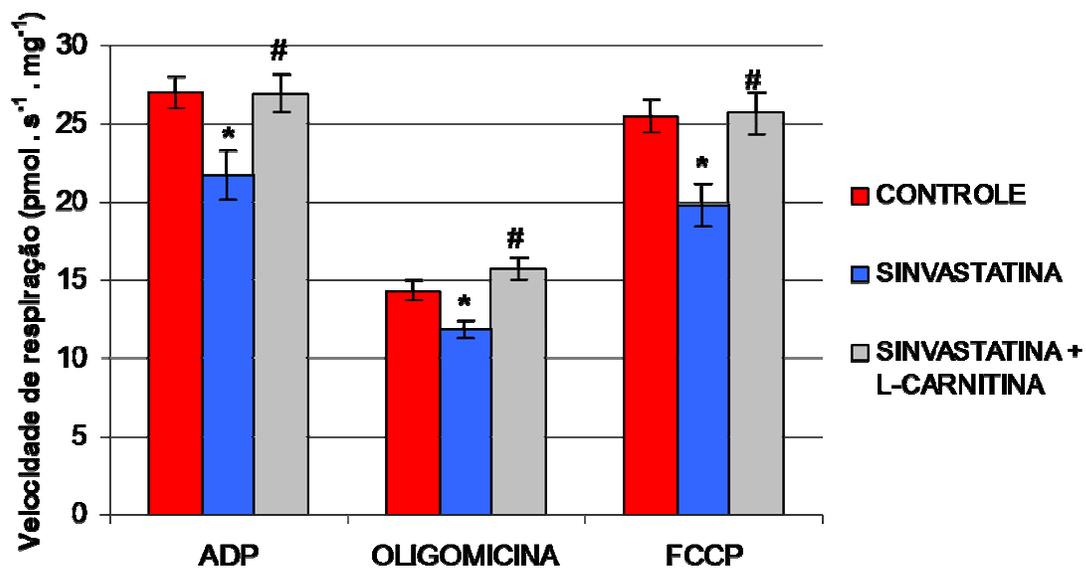


Figura 16 Velocidades de respiração mitocondrial em biópsias de músculo esquelético de ratos tratados com sinvastatina e ou L-carnitina. Biópsias de 2-3 mg foram adicionadas ao meio MiR05 padrão. Foram adicionados ADP 400 μ M, oligomicina 1 μ g/ml e FCCP 0,2 μ M. n = no mínimo 6 experimentos independentes, * estatisticamente diferente do controle ($p < 0,05$), # estatisticamente diferente de sinvastatina ($p < 0,05$).

5 - DISCUSSÃO

Estatinas são medicamentos muito utilizados para combater os níveis elevados de colesterol com comprovada eficiência e tolerabilidade. Cerca de 30 milhões de pessoas tinham prescrição para o uso desses fármacos nos EUA segundo dados do US DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, de 2005. Alguns pacientes que fazem uso de estatinas podem apresentar alguns efeitos colaterais como danos a função hepática, em nervos periféricos e em músculos esqueléticos. O efeito colateral mais comum é a miopatia e dentro desta, 10% dos pacientes que utilizam estatinas apresentam mialgias e 1,5 em 10 milhões de pacientes apresentam rabdomiólise fatal (Venero e Thompson, 2009). Esses efeitos colaterais estão sendo atribuídos, em alguns casos, a atuação direta desses fármacos sobre as mitocôndrias, como demonstram alguns trabalhos na literatura (Sirvent et al., 2005; Kaufmann et al., 2006). Trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa (Velho et. al., 2005; Oliveira et al., 2008) mostraram que mitocôndrias isoladas de músculo de ratos sobre a ação de lovastatina apresentavam uma maior susceptibilidade à transição de permeabilidade mitocondrial. Outros autores mostram ainda que as estatinas podem atuar inibindo os complexos da cadeia de transporte de elétrons em biópsias e mitocôndrias isoladas de músculo de ratos, ativando vias de apoptose iniciadas pela mitocôndria em culturas de células musculares humanas (Sirvent et al., 2005; Kaufmann et al., 2006).

Os trabalhos citados anteriormente levaram a criação da hipótese de que os efeitos tóxicos das estatinas poderiam ser consequência dos seus efeitos na respiração mitocondrial de diferentes tecidos. Para testar essa hipótese fizemos então uma curva de dose resposta do efeito da sinvastatina sobre o consumo de oxigênio de fibras musculares de ratos. Os resultados mostraram inibição das velocidades respiratórias estimuladas por ADP e FCCP de maneira dose dependente, sendo que a inibição causada por 1 μ M de sinvastatina reduziu em cerca de 25 % a respiração estimulada por ADP e em 27 % a respiração estimulada por FCCP. A concentração de 1 μ M de sinvastatina é relativamente baixa quando comparada às doses usadas em outros trabalhos científicos, mostrando assim que em concentrações próximas as terapêuticas, a sinvastatina

pode ter efeito inibitório sobre a respiração mitocondrial. Sirvent e colaboradores (2005) mostraram que nas condições experimentais por eles utilizadas a inibição das velocidades de respiração estimuladas por ADP em biópsias musculares foi significativa apenas com 10 μM , sendo que com 50 μM a inibição foi em torno de 20% (Sirvent et al., 2005). Em um trabalho que mediu a atividade de cada complexo da cadeia respiratória de mitocôndrias bovinas de coração, o IC_{50} de inibição da atividade dos complexos foi de no mínimo 30 μM de sinvastatina (Nadanaciva et al., 2006). Já em outro trabalho realizado com mitocôndrias isoladas de músculo de ratos a inibição da velocidade de consumo de oxigênio estimulada por ADP somente foi significativa com a adição de 100 μM de sinvastatina, sendo que neste mesmo trabalho a concentração mínima de sinvastatina que causou citotoxicidade significativa (averiguada pela quantidade de liberação da enzima lactato desidrogenase) em células de músculo de rato (L6) foi de 100 μM (Kaufmann et al., 2006).

As estatinas atuam inibindo a enzima HMG-CoA redutase, uma enzima chave na via de síntese do colesterol, evitando assim a formação do intermediário mevalonato, e assim do produto final, o colesterol. Na tentativa de desvendar o mecanismo pelo qual a inibição das velocidades de consumo de oxigênio ocorre e se esse efeito é dependente da inibição da síntese do colesterol ou de algum outro composto desta via metabólica incluímos 100 μM de mevalonato no meio de reação contendo as biópsias tratadas com sinvastatina. O mevalonato aumentou significativamente as velocidades de consumo de oxigênio inibidas pela ação da sinvastatina, mostrando que esse efeito é dependente da inibição da via de síntese do colesterol. Vários trabalhos já haviam mostrado que os efeitos tóxicos das estatinas podiam ser revertidos com a utilização de mevalonato em diversos tipos de células (Kaneta et al., 2003; Cafforio et al., 2005; Sacher et al., 2005). Em células endoteliais de veias pulmonares de ratos o mevalonato reverteu o efeito da estatina na diminuição da viabilidade e da fragmentação de DNA (Kaneta et al., 2003). Em linfoblastos tratados com estatinas o mevalonato também protegeu a ação das estatinas, sobre a diminuição da proliferação celular (Cafforio et al., 2005). Em células musculares o tratamento com sinvastatina reduz a proliferação

celular e aumenta a atividade de caspases por mecanismo sensível ao mevalonato (Sacher et al., 2005).

Quando adicionamos coenzima Q10, ao invés de mevalonato, no meio de incubação contendo as biópsias musculares tratadas com sinvastatina, tivemos uma proteção total contra os efeitos inibitórios nas velocidades de consumo de oxigênio estimuladas tanto por ADP quanto por FCCP. Esses dados e alguns trabalhos na literatura (De Pinieux et al., 1996; Schaefer et al., 2004; Kettawan et al., 2006; Young et al., 2007) levantam a hipótese de que esse efeito tóxico poderia estar relacionado com a diminuição da coenzima Q10, outro produto da via em que participa a enzima HMG-CoA redutase. De fato, dados da literatura mostram que ratos tratados com cerivastatina têm níveis de ubiquinona muscular diminuídos em relação aos ratos controles (Schaefer et al., 2004). Kettawan e colaboradores (2006) mostraram que em camundongos tratados com sinvastatina os níveis de coenzima Q10 plasmáticos, hepático e em suas mitocôndrias, no coração e em suas mitocôndrias também estavam diminuídos e foram restabelecidos pela adição de coenzima Q10. Além disso o tratamento concomitante com Co-Q10 preveniu a peroxidação lipídica induzidas em mitocôndrias de coração por Fe^{2+} (Kettawan et al., 2006). Observou-se que pacientes com mialgia devido ao uso de sinvastatina também tinham diminuição de coenzima Q10 plasmática e quando tratados com Q10 esses níveis aumentaram (Young et al., 2007). Outro estudo com pacientes hipercolesterolêmicos mostrou que a sinvastatina causou diminuição de ubiquinona plasmática (De Pinieux et al., 1996). Sirvent e colaboradores observaram que a inibição nas velocidades de respiração máximas de biópsias musculares ocorria independentemente do substrato respiratório usado (Sirvent et al., 2005). Esses resultados indicam que essa diminuição ocorre na cadeia respiratória e não nas vias metabólicas que geram substratos tais como β -oxidação, glicólise ou o ciclo de Krebs. Esse resultado conjuntamente com os dados obtidos nesta tese indica que essa diminuição da respiração deve ser conseqüência de diminuição na produção de coenzima Q10.

Outro composto que apresentou proteção contra a inibição nas velocidades de consumo de oxigênio, causada pela sinvastatina, foi a L-carnitina. Esse composto protege as mitocôndrias isoladas de fígado de rato contra a TPM induzida pelo ácido nitropropiónico. Sabe-se que este composto causa diminuição na captação mitocondrial de Ca^{2+} , inchamento da organela e inibição na velocidade de respiração estimulada por ADP quando succinato é o substrato respiratório. Os autores interpretam que o restabelecimento de todos esses efeitos da sinvastatina pela L-carnitina foi mediado pelo estímulo da β -oxidação (Nishimura et al., 2008). Outro trabalho com mitocôndrias isoladas de fígado de rato mostrou que a L-carnitina preveniu o inchamento mitocondrial, a perda de potencial de membrana e a liberação do citocromo C, induzidos por ácido oléico (Oyanagi et al., 2008). Um éster da L-carnitina, a acetil-L-carnitina, também atua na proteção de mitocôndrias isoladas de cérebro de rato, prevenindo o aumento na formação de proteínas carboniladas e a deleção do DNA mitocondrial induzidos por metanfetamina (Alves et al., 2008). Arduini e colaboradores (2004) mostraram que a L-carnitina protegeu contra os efeitos tóxicos causados em ratos pelo tratamento de 15 dias com sinvastatina e diminuiu os níveis plasmáticos de creatina quinase aumentados pelo uso de sinvastatina e promoveu uma melhora na locomoção dos animais sobre o efeito do fármaco (Arduini et al., 2004).

Os mecanismos pelos quais a L-carnitina exerce essa proteção não são muito claros na literatura, mas várias hipóteses foram lançadas. A L-carnitina atua como agente antioxidante prevenindo o acúmulo dos produtos finais da peroxidação lipídica (Fabriello e Calabrese, 1988; Lowitt et al., 1995), agindo como seqüestrador dos radicais ânion superóxido e peróxido de hidrogênio, além de quelar ferro, evitando assim a reação de Fenton e a formação de radical hidroxil que é altamente reativo (Gülçin, 2005). Outros mecanismos propostos são: 1) transportar maior quantidade de ácidos graxos para a matriz mitocondrial, fornecendo mais substratos para a respiração mitocondrial; 2) remover compostos acil tóxicos da matriz mitocondrial (Virmani et al., 2003); 3) atuar diretamente sobre as membranas mitocondriais prevenindo a perda de cardiolipina e evitar a TPM (Virmani et al., 2003). Os dados obtidos nesta tese com a reposição de

coenzima Q10 (figura 8) sugerem que além dos efeitos acima, a L-carnitina, de alguma forma, protege contra a diminuição de coenzima Q10.

A inibição da respiração causada pela sinvastatina sugere que esse fármaco diminui a produção de ATP mitocondrial, com conseqüente estímulo da glicólise. O aumento na razão lactato/piruvato no plasma e no músculo também foi mostrado por outros autores (Robinson, 1989; Munnich et al., 1992). De fato, essa razão é utilizada como teste não invasivo para detectar disfunções ou efeitos de agentes tóxicos sobre as mitocôndrias (Robinson, 1989; Munnich et al., 1992; Chariot et al., 1994). Neste sentido, tem sido mostrado que pacientes hipercolesterolêmicos que faziam uso de estatinas apresentaram aumento na razão lactato/piruvato plasmático, conjuntamente com níveis plasmáticos reduzidos de coenzima Q10 (De Pinieux et al., 1996). Neste trabalho, biópsias musculares tratadas com 1 μ M de sinvastatina apresentaram um aumento na produção de lactato (figura 11), sugerindo que a inibição da respiração (figura 1) é suficiente para diminuir a produção de ATP mitocondrial. A diminuição, dose dependente, dos níveis de ATP foi relatada também em culturas de mioblastos humanos tratados com estatinas (Wagner et al., 2008; Van Vliet et al., 1996).

A acidificação intracelular resultante do aumento do lactato deve ser um dos fatores envolvidos na morte celular induzida por estatinas (Oliveira et al., 2008), uma vez que o bicarbonato protege contra a morte celular em linhagens de músculo esquelético (L6) tratadas com cerivastatina (Kobayashi et al., 2008). No mesmo trabalho mostrou-se que o tratamento de ratos com cerivastatina aumentou os níveis plasmáticos de creatina quinase, o que também foi protegido pela administração simultânea de bicarbonato (Kobayashi et al., 2008). O bicarbonato é usado clinicamente para o tratamento da acidose láctica (Kawanishi et al., 1998) e está envolvido na regulação do pH celular (Izumi et al., 2003). Sabe-se também que a acidificação artificial do citosol induz ativação de caspases e apoptose (Baumgart et al., 1996; Hirpara et al., 2001). Assim, estes efeitos de sinvastatina sobre a respiração e os níveis de lactato e ATP podem explicar a dor muscular (Rossi e Decchi, 1995; Issberner et al., 1996; Frey Law et al., 2008) em alguns pacientes que fazem uso de estatinas.

Os experimentos da figura 10 mostram que 1 μM de sinvastatina, como utilizada em biópsias musculares, não inibiu o consumo de oxigênio em mitocôndrias isoladas de músculo. Isto sugere que a sinvastatina, nesta concentração, não tem efeito direto sobre a respiração mitocondrial, e apóia a hipótese de que seu efeito tóxico sobre a respiração celular é dependente da inibição da produção de coenzima Q10. Por outro lado o tratamento *in vivo*, por 15 dias com 100 mg/kg de sinvastatina, mostrou que as biópsias musculares destes animais consomem menos oxigênio em todas as velocidades respiratórias. Este efeito também é compatível com a diminuição de coenzima Q10 nas mitocôndrias. O tratamento concomitante com 200 mg/kg de L-carnitina protegeu contra esses efeitos, restaurando todas as velocidades de respiração. Estes resultados estão de acordo com Arduini e colaboradores (2004), mostrando que a L-carnitina atua na proteção contra os efeitos miotóxicos em ratos tratados com sinvastatina (Arduini et al., 2004).

Neste trabalho realizamos também experimentos para averiguar os efeitos da sinvastatina sobre a respiração de biópsias de fígado de ratos, uma vez que cerca de 3% dos pacientes que utilizam estatinas apresentam hepatotoxicidade (Paragh e Fülöp, 2009). Neste sentido, Tavintharan e colaboradores (2007) mostraram aumento de morte celular sensível a CoQ10 em células hepáticas tratadas com 10 μM de sinvastatina. Nossos resultados com biópsias de fígado mostraram que a sinvastatina causa inibição de maneira dose dependente nas velocidades de consumo de oxigênio estimuladas por ADP e FCCP, mas, diferentemente das biópsias de músculo, a inibição só ocorreu de forma significativa com concentração de 5 μM . Por outro lado, mevalonato, coenzima Q10 e L-carnitina, não tiveram efeitos protetores sobre estas biópsias, sugerindo, que o mecanismo de toxicidade pode ser diferente no fígado. De fato Arduini e colaboradores (2004) mostraram que a L-carnitina não restaurou os níveis plasmáticos de alanina e aspartato aminotransferase em ratos tratados com sinvastatina.

6 - CONCLUSÕES

Os resultados do presente trabalho mostram, pela primeira vez, que doses baixas de sinvastatina (1 μ M), provavelmente compatíveis com os níveis intracelulares alcançados por doses terapêuticas em pacientes hipercolesterolêmicos inibem a respiração mitocondrial em biópsias de músculo esquelético. Este efeito foi revertido por mevalonato, coenzima Q10 ou L-carnitina. Os efeitos dos dois primeiros compostos sugerem uma ação da sinvastatina (não direta sobre a cadeia respiratória) através da inibição da HMG-CoA redutase, com a conseqüente diminuição de coenzima Q10 mitocondrial. O aumento de lactato celular é compatível com uma condição de hipóxia química (diminuição da respiração e da produção de ATP por um composto químico) e poderia explicar a dor muscular em usuários de estatinas. Embora o presente trabalho mostre que a L-carnitina previne a inibição da respiração causada por sinvastatina, o mecanismo molecular deste efeito não foi identificado em nossos experimentos.

7 - REFERÊNCIAS

Alves, E., Z. Binienda, *et al.* Acetyl-L-carnitine provides effective in vivo neuroprotection over 3,4-methylenedioxymethamphetamine-induced mitochondrial neurotoxicity in the adolescent rat brain. Neuroscience, v.158, n.2, Jan 23, p.514-23. 2009.

Arduini, A., A. Peschechera, *et al.* Improvement of statin-associated myotoxicity by L-carnitine. J Thromb Haemost, v.2, n.12, Dec, p.2270-1. 2004.

Baker, S. K. e M. A. Tarnopolsky. Statin myopathies: pathophysiologic and clinical perspectives. Clin Invest Med, v.24, n.5, Oct, p.258-72. 2001.

Ballantyne, C. M. Clinical trial endpoints: angiograms, events, and plaque instability. Am J Cardiol, v.82, n.6A, Sep 24, p.5M-11M. 1998.

Bargossi, A. M., M. Battino, *et al.* Exogenous CoQ10 preserves plasma ubiquinone levels in patients treated with 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. Int J Clin Lab Res, v.24, n.3, p.171-6. 1994.

Baumgart, E., H. D. Fahimi, *et al.* L-lactate dehydrogenase A4- and A3B isoforms are bona fide peroxisomal enzymes in rat liver. Evidence for involvement in intraperoxisomal NADH reoxidation. J Biol Chem, v.271, n.7, Feb 16, p.3846-55. 1996.

Berliner, J. A. e J. W. Heinecke. The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis. Free Radic Biol Med, v.20, n.5, p.707-27. 1996.

Bernard, A., C. Rigault, *et al.* L-carnitine supplementation and physical exercise restore age-associated decline in some mitochondrial functions in the rat. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, v.63, n.10, Oct, p.1027-33. 2008.

Bliznakov, E. G. Lipid-lowering drugs (statins), cholesterol, and coenzyme Q10. The Baycol case--a modern Pandora's box. Biomed Pharmacother, v.56, n.1, Feb, p.56-9. 2002.

Boveris, A. e B. Chance. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. Biochem J, v.134, n.3, Jul, p.707-16. 1973.

Brown, M. S. e J. L. Goldstein. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. Science, v.232, n.4746, Apr 4, p.34-47. 1986.

Cafforio, P., F. Dammacco, *et al.* Statins activate the mitochondrial pathway of apoptosis in human lymphoblasts and myeloma cells. Carcinogenesis, v.26, n.5, May, p.883-91. 2005.

Chariot, P., I. Monnet, *et al.* Determination of the blood lactate:pyruvate ratio as a noninvasive test for the diagnosis of zidovudine myopathy. Arthritis Rheum, v.37, n.4, Apr, p.583-6. 1994.

De Pinieux, G., P. Chariot, *et al.* Lipid-lowering drugs and mitochondrial function: effects of HMG-CoA reductase inhibitors on serum ubiquinone and blood lactate/pyruvate ratio. Br J Clin Pharmacol, v.42, n.3, Sep, p.333-7. 1996.

Devlin, TM. Manual de bioquímica com correlações clínicas. São Paulo: Edgard Blucher, 2000.

Di Cesare Mannelli, L., C. Ghelardini, *et al.* Protective effect of acetyl-L-carnitine on the apoptotic pathway of peripheral neuropathy. Eur J Neurosci, v.26, n.4, Aug, p.820-7. 2007.

Endo, A., M. Kuroda, *et al.* ML-236A, ML-236B, and ML-236C, new inhibitors of cholesterologenesis produced by *Penicillium citrinium*. J Antibiot (Tokyo), v.29, n.12, Dec, p.1346-8. 1976.

Endo, A. The discovery and development of HMG-CoA reductase inhibitors. J Lipid Res, v.33, n.11, Nov, p.1569-82. 1992.

Esterbauer, H., M. Dieber-Rotheneder, *et al.* Endogenous antioxidants and lipoprotein oxidation. Biochem Soc Trans, v.18, n.6, Dec, p.1059-61. 1990.

Fabriello R.G., C. F. Prevention of ischemia induced increase in MDA by acetyl carnitine. Annals of Neurology, v.24, p.4. 1988.

Fichtenbaum, C. J., J. G. Gerber, *et al.* Pharmacokinetic interactions between protease inhibitors and statins in HIV seronegative volunteers: ACTG Study A5047. AIDS, v.16, n.4, Mar 8, p.569-77. 2002.

Frey Law, L. A., K. A. Sluka, *et al.* Acidic buffer induced muscle pain evokes referred pain and mechanical hyperalgesia in humans. Pain, v.140, n.2, Nov 30, p.254-64. 2008.

Fritz, I. B. e E. Arrigoni-Martelli. Sites of action of carnitine and its derivatives on the cardiovascular system: interactions with membranes. Trends Pharmacol Sci, v.14, n.10, Oct, p.355-60. 1993.

Furuno, T., T. Kanno, *et al.* Roles of long chain fatty acids and carnitine in mitochondrial membrane permeability transition. Biochem Pharmacol, v.62, n.8, Oct 15, p.1037-46. 2001.

Futterman, L. G. e L. Lemberg. Statin pleiotropy: fact or fiction? Am J Crit Care, v.13, n.3, May, p.244-9. 2004.

Ghirlanda, G., A. Oradei, *et al.* Evidence of plasma CoQ10-lowering effect by HMG-CoA reductase inhibitors: a double-blind, placebo-controlled study. J Clin Pharmacol, v.33, n.3, Mar, p.226-9. 1993.

Gornall, A. G., C. J. Bardawill, *et al.* Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. J Biol Chem, v.177, n.2, Feb, p.751-66. 1949.

Gulcin, I. Antioxidant and antiradical activities of L-carnitine. Life Sci, v.78, n.8, Jan 18, p.803-11. 2006.

Gunter, T. E., K. K. Gunter, *et al.* Mitochondrial calcium transport: physiological and pathological relevance. Am J Physiol, v.267, n.2 Pt 1, Aug, p.C313-39. 1994.

Halliwell, B. e J. M. Gutteridge. Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation. An update. FEBS Lett, v.307, n.1, Jul 27, p.108-12. 1992.

Hirpara, J. L., M. V. Clement, *et al.* Intracellular acidification triggered by mitochondrial-derived hydrogen peroxide is an effector mechanism for drug-induced apoptosis in tumor cells. J Biol Chem, v.276, n.1, Jan 5, p.514-21. 2001.

Hobbs, H. H., M. S. Brown, *et al.* Molecular genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia. Hum Mutat, v.1, n.6, p.445-66. 1992.

Hoek, J. B. e J. Rydstrom. Physiological roles of nicotinamide nucleotide transhydrogenase. Biochem J, v.254, n.1, Aug 15, p.1-10. 1988.

Ikonen, E. Mechanisms for cellular cholesterol transport: defects and human disease. Physiol Rev, v.86, n.4, Oct, p.1237-61. 2006.

Inano, A., Y. Sai, *et al.* Acetyl-L-carnitine permeability across the blood-brain barrier and involvement of carnitine transporter OCTN2. Biopharm Drug Dispos, v.24, n.8, Nov, p.357-65. 2003.

Issberner, U., P. W. Reeh, *et al.* Pain due to tissue acidosis: a mechanism for inflammatory and ischemic myalgia? Neurosci Lett, v.208, n.3, Apr 26, p.191-4. 1996.

Izumi, H., T. Torigoe, *et al.* Cellular pH regulators: potentially promising molecular targets for cancer chemotherapy. Cancer Treat Rev, v.29, n.6, Dec, p.541-9. 2003.

Jo, S. H., M. K. Son, *et al.* Control of mitochondrial redox balance and cellular defense against oxidative damage by mitochondrial NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase. J Biol Chem, v.276, n.19, May 11, p.16168-76. 2001.

Kaneta, S., K. Satoh, *et al.* All hydrophobic HMG-CoA reductase inhibitors induce apoptotic death in rat pulmonary vein endothelial cells. Atherosclerosis, v.170, n.2, Oct, p.237-43. 2003.

Kaplan, R. S. e P. L. Pedersen. Characterization of phosphate efflux pathways in rat liver mitochondria. Biochem J, v.212, n.2, May 15, p.279-88. 1983.

Kaufmann, P., M. Torok, *et al.* Toxicity of statins on rat skeletal muscle mitochondria. Cell Mol Life Sci, v.63, n.19-20, Oct, p.2415-25. 2006.

Kawanishi, K., S. Tada, *et al.* [Lactate metabolism and lactic acidosis]. Rinsho Byori, v.46, n.8, Aug, p.804-12. 1998.

Kettawan, A., T. Takahashi, *et al.* Protective effects of coenzyme q(10) on decreased oxidative stress resistance induced by simvastatin. J Clin Biochem Nutr, v.40, n.3, May, p.194-202. 2007.

Klatt, P. e H. Esterbauer. Oxidative hypothesis of atherogenesis. J Cardiovasc Risk, v.3, n.4, Aug, p.346-51. 1996.

Klingenberg, M. e D. R. Nelson. Structure-function relationships of the ADP/ATP carrier. Biochim Biophys Acta, v.1187, n.2, Aug 30, p.241-4. 1994.

Knight-Lozano, C. A., C. G. Young, *et al.* Cigarette smoke exposure and hypercholesterolemia increase mitochondrial damage in cardiovascular tissues. Circulation, v.105, n.7, Feb 19, p.849-54. 2002.

Kobayashi, M., F. Kaido, *et al.* Preventive effects of bicarbonate on cerivastatin-induced apoptosis. Int J Pharm, v.341, n.1-2, Aug 16, p.181-8. 2007.

Kobayashi, M., T. Kagawa, *et al.* Bicarbonate supplementation as a preventive way in statins-induced muscle damage. J Pharm Pharm Sci, v.11, n.1, p.1-8. 2008.

Kowaltowski, A. J., R. F. Castilho, *et al.* Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. FEBS Lett, v.495, n.1-2, Apr 20, p.12-5. 2001.

Kuznetsov, A. V., V. Veksler, *et al.* Analysis of mitochondrial function in situ in permeabilized muscle fibers, tissues and cells. Nat Protoc, v.3, n.6, p.965-76. 2008.

Nelson, N.L. e Cox, M.M. Lehninger Principles of Biochemistry. New York: W. H. Freeman, 2004.

Lewin, J. J., 3rd, J. M. Nappi, *et al.* Rhabdomyolysis with concurrent atorvastatin and diltiazem. Ann Pharmacother, v.36, n.10, Oct, p.1546-9. 2002.

Liao, J. K. Beyond lipid lowering: the role of statins in vascular protection. Int J Cardiol, v.86, n.1, Nov, p.5-18. 2002.

Liu, S. S. Generating, partitioning, targeting and functioning of superoxide in mitochondria. Biosci Rep, v.17, n.3, Jun, p.259-72. 1997.

Lowitt, S., J. I. Malone, *et al.* Acetyl-L-carnitine corrects the altered peripheral nerve function of experimental diabetes. Metabolism, v.44, n.5, May, p.677-80. 1995.

Mannelli L.D.C., Ghelardini C., Calvani M., Nicolai R., Mosconi L., Vivoli E., Pacini A., Bartolini A. Protective effect of acetyl-L-carnitine on the apoptotic pathway of peripheral neuropathy. European Journal of Neuroscience, v.26, p. 820-27. 2007.

Maron, D. J., S. Fazio, *et al.* Current perspectives on statins. Circulation, v.101, n.2, Jan 18, p.207-13. 2000.

Marzzoco A., Torres B.B. Bioquímica Básica. Rio de Janeiro: Ganabara Koogan, 2007.

Mctaggart, F., L. Buckett, *et al.* Preclinical and clinical pharmacology of Rosuvastatin, a new 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor. Am J Cardiol, v.87, n.5A, Mar 8, p.28B-32B. 2001.

Mitchell, P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. Nature, v.191, Jul 8, p.144-8. 1961.

Munnich, A., P. Rustin, *et al.* Clinical aspects of mitochondrial disorders. J Inherit Metab Dis, v.15, n.4, p.448-55. 1992.

Muscari, A., G. M. Puddu, *et al.* Lipid-lowering drugs: are adverse effects predictable and reversible? Cardiology, v.97, n.3, p.115-21. 2002.

Nadanaciva, S., A. Bernal, *et al.* Target identification of drug induced mitochondrial toxicity using immunocapture based OXPHOS activity assays. Toxicol In Vitro, v.21, n.5, Aug, p.902-11. 2007.

Nakahara, K., T. Yada, *et al.* Cytosolic Ca²⁺ increase and cell damage in L6 rat myoblasts by HMG-CoA reductase inhibitors. Biochem Biophys Res Commun, v.202, n.3, Aug 15, p.1579-85. 1994.

Navab, M., A. M. Fogelman, *et al.* Pathogenesis of atherosclerosis. Am J Cardiol, v.76, n.9, Sep 28, p.18C-23C. 1995.

Nicholls D.G., Ferguson S.J. Proton Current and Respiratory Control. In: Bioenergetics 3, London, Academic Press Inc., 3th edition, p. 69-75. 2002.

Nishimura, M., Y. Okimura, *et al.* Mechanism of 3-nitropropionic acid-induced membrane permeability transition of isolated mitochondria and its suppression by L-carnitine. Cell Biochem Funct, v.26, n.8, Dec, p.881-91. 2008.

Noland, R. C., T. R. Koves, *et al.* Carnitine insufficiency caused by aging and overnutrition compromises mitochondrial performance and metabolic control. J Biol Chem, v.284, n.34, Aug 21, p.22840-52. 2009.

Oliveira, K. A., K. G. Zecchin, *et al.* Simvastatin inducing PC3 prostate cancer cell necrosis mediated by calcineurin and mitochondrial dysfunction. J Bioenerg Biomembr, v.40, n.4, Aug, p.307-14. 2008.

Omar, M. A. e J. P. Wilson. FDA adverse event reports on statin-associated rhabdomyolysis. Ann Pharmacother, v.36, n.2, Feb, p.288-95. 2002.

Oyanagi, E., H. Yano, *et al.* L-Carnitine suppresses oleic acid-induced membrane permeability transition of mitochondria. Cell Biochem Funct, v.26, n.7, Oct, p.778-86. 2008.

Paragh, G. e P. Fulop. [Impact of lipid lowering therapy on liver function]. Orv Hetil, v.150, n.26, Jun 28, p.1205-12. 2009.

Puddu, G. M., E. Cravero, *et al.* Molecular aspects of atherogenesis: new insights and unsolved questions. J Biomed Sci, v.12, n.6, Dec, p.839-53. 2005.

Rector, R. S. e J. A. Ibdah. Fatty acid oxidation disorders: maternal health and neonatal outcomes. Semin Fetal Neonatal Med, Nov 16. 2009.

Robinson B.H. Lactic acidemia In *The metabolic basis of inherited disease*. 6th ed., eds. Scriver C.R., Beaudet A.L., Sly W.S., Valle D., McGraw Hill, New York, p. 869–888. 1989.

Rosenson, R. S. Current overview of statin-induced myopathy. Am J Med, v.116, n.6, Mar 15, p.408-16. 2004.

Rossi, A. e B. Decchi. Cutaneous nociceptive facilitation of Ib heteronymous pathways to lower limb motoneurons in humans. Brain Res, v.700, n.1-2, Nov 27, p.164-72. 1995.

Sacher, J., L. Weigl, *et al.* Delineation of myotoxicity induced by 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase inhibitors in human skeletal muscle cells. J Pharmacol Exp Ther, v.314, n.3, Sep, p.1032-41. 2005.

Schaefer, W. H., J. W. Lawrence, *et al.* Evaluation of ubiquinone concentration and mitochondrial function relative to cerivastatin-induced skeletal myopathy in rats. Toxicol Appl Pharmacol, v.194, n.1, Jan 1, p.10-23. 2004.

Shaukat, A., M. Benekli, *et al.* Simvastatin-fluconazole causing rhabdomyolysis. Ann Pharmacother, v.37, n.7-8, Jul-Aug, p.1032-5. 2003.

Shitara, Y. e Y. Sugiyama. Pharmacokinetic and pharmacodynamic alterations of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors: drug-drug interactions and interindividual differences in transporter and metabolic enzyme functions. Pharmacol Ther, v.112, n.1, Oct, p.71-105. 2006.

Sirvent, P., J. Mercier, *et al.* Simvastatin triggers mitochondria-induced Ca²⁺ signaling alteration in skeletal muscle. Biochem Biophys Res Commun, v.329, n.3, Apr 15, p.1067-75. 2005a.

Sirvent, P., S. Bordenave, *et al.* Simvastatin induces impairment in skeletal muscle while heart is protected. Biochem Biophys Res Commun, v.338, n.3, Dec 23, p.1426-34. 2005b.

Sirvent, P., J. Mercier, *et al.* New insights into mechanisms of statin-associated myotoxicity. Curr Opin Pharmacol, v.8, n.3, Jun, p.333-8. 2008.

Sociedade Brasileira de Cardiologia. IV Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial. Arq Bras Cardiol, v.82. 2004

Staffa, J. A., J. Chang, *et al.* Cerivastatin and reports of fatal rhabdomyolysis. N Engl J Med, v.346, n.7, Feb 14, p.539-40. 2002.

Stephens, F. B., D. Constantin-Teodosiu, *et al.* New insights concerning the role of carnitine in the regulation of fuel metabolism in skeletal muscle. J Physiol, v.581, n.Pt 2, Jun 1, p.431-44. 2007.

Tavintharan, S., C. N. Ong, *et al.* Reduced mitochondrial coenzyme Q10 levels in HepG2 cells treated with high-dose simvastatin: a possible role in statin-induced hepatotoxicity? Toxicol Appl Pharmacol, v.223, n.2, Sep 1, p.173-9. 2007.

Tonkonogi, M. e K. Sahlin. Rate of oxidative phosphorylation in isolated mitochondria from human skeletal muscle: effect of training status. Acta Physiol Scand, v.161, n.3, Nov, p.345-53. 1997.

Turrens, J. F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. J Physiol, v.552, n.Pt 2, Oct 15, p.335-44. 2003.

Ucar, M., T. Mjorndal, *et al.* HMG-CoA reductase inhibitors and myotoxicity. Drug Saf, v.22, n.6, Jun, p.441-57. 2000.

Van Vliet, A. K., P. Negre-Aminou, *et al.* Action of lovastatin, simvastatin, and pravastatin on sterol synthesis and their antiproliferative effect in cultured myoblasts from human striated muscle. Biochem Pharmacol, v.52, n.9, Nov 8, p.1387-92. 1996.

Velho, J. A., H. Okanobo, *et al.* Statins induce calcium-dependent mitochondrial permeability transition. Toxicology, v.219, n.1-3, Feb 15, p.124-32. 2006.

Venero, C. V. e P. D. Thompson. Managing statin myopathy. Endocrinol Metab Clin North Am, v.38, n.1, Mar, p.121-36. 2009.

Virmani, M. A., R. Biselli, *et al.* Protective actions of L-carnitine and acetyl-L-carnitine on the neurotoxicity evoked by mitochondrial uncoupling or inhibitors. Pharmacol Res, v.32, n.6, Dec, p.383-9. 1995.

Virmani, A., F. Gaetani, *et al.* Possible mechanism for the neuroprotective effects of L-carnitine on methamphetamine-evoked neurotoxicity. Ann N Y Acad Sci, v.993, May, p.197-207; discussion 287-8. 2003.

Wagner, B. K., T. Kitami, *et al.* Large-scale chemical dissection of mitochondrial function. Nat Biotechnol, v.26, n.3, Mar, p.343-51. 2008.

Wilcox, H. G. e M. Heimberg. The isolation of human serum lipoproteins by zonal ultracentrifugation. Biochim Biophys Acta, v.152, n.2, Mar 4, p.424-6. 1968.

World Health Organization. A race against the time: The challenge of cardiovascular disease in developing economies. 94p. 2003.

Young, J. M., C. M. Florkowski, *et al.* Effect of coenzyme Q(10) supplementation on simvastatin-induced myalgia. Am J Cardiol, v.100, n.9, Nov 1, p.1400-3. 2007.