

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

CINTIA YURI MATSUMURA

**“INFLUÊNCIA DE BLOQUEADORES DE CANAIS DE
CÁLCIO NO PROCESSO DE
DEGENERAÇÃO/REGENERAÇÃO MUSCULAR EM
CAMUNDONGOS DISTRÓFICOS *MDX*”**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)

Cintia Yuri Matsumura

M. J. Marques

e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Mestre em Biologia Celular e Estrutural,
na área de Anatomia.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Julia Marques

Campinas, 2008

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

M429i

Matsumura, Cintia Yuri

Influência de bloqueadores de canais de cálcio no processo de degeneração/regeneração muscular em camundongos *mdx* / Cintia Yuri Matsumura. – Campinas, SP: [s.n.], 2008.

Orientadora: Maria Julia Marques.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Camundongo *mdx*. 2. Músculos - Degeneração. 3. Cálcio. 4. Diltiazem. 5. Verapamil. I. Marques, Maria Julia. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(rcdt/ib)

Título em inglês: The influence of calcium channel blockers in the process of muscular degeneration/regeneration in *mdx* mice.

Palavras-chave em inglês: *Mdx* mice; Muscle degeneration; Calcium; Verapamil; Diltiazem.

Área de concentração: Biologia Celular.

Titulação: Mestre em Biologia Celular e Estrutural.

Banca examinadora: Maria Julia Marques, Luís Garcia Alonso, Maeli Dal Pai Silva.

Data da defesa: 02/06/2008.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural.

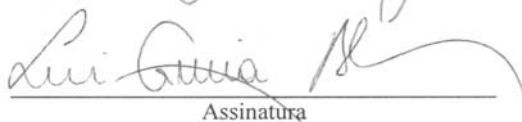
Campinas, 02 de Junho de 2008.

BANCA EXAMINADORA

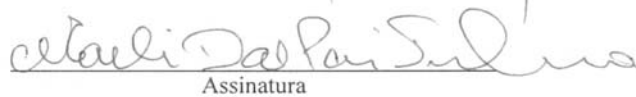
Profa. Dra. Maria Julia Marques (Orientadora)


Assinatura

Prof. Dr. Luís Alonso Garcia


Assinatura

Profa. Dra. Maeli Dal Pai Silva


Assinatura

Profa. Dra. Laurecir Gomes

Assinatura

Profa. Dra. Elaine Cristina Leite Pereira

Assinatura

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, **Masaharu e Rieko**, e irmãos, **Márcia e Alexandre** pelo amor, incentivo e apoio em todos os momentos e que foram indispensáveis para realização de mais este importante passo em minha vida.

Ao **Gian** pelo amor, carinho, companheirismo, compreensão, estímulo e paciência em todos os momentos.

À **Profa. Dra. Maria Júlia Marques** pelos conhecimentos, colaboração, incentivo e paciência ao longo de todo o desenvolvimento deste trabalho. Pela confiança e por ter conduzido meus passos na vida acadêmica.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural** pela excelência na formação profissional de seus alunos.

À **FAPESP e a CAPES** pela concessão de bolsa e financiamento do projeto, o que tornou possível a execução e finalização deste trabalho.

Aos amigos do laboratório de Biologia Estrutural do Sistema Neuromuscular: **Tereza, Adriana, Ana Paula, Renato, Érika e Rafael** que sempre me apoiaram e auxiliaram durante os experimentos.

Ao **Prof. Dr. Humberto Santo Neto** pelas importantes considerações para a realização deste trabalho.

À **Profa. Dra. Elaine Minatel** pelas importantes considerações para a realização deste trabalho e durante o exame de qualificação, e por sempre acreditar no meu retorno a vida acadêmica.

À **Profa. Dra. Evanisi Teresa Palomari** e à **Profa. Dra. Lúcia Elvira Álvares** pelas pertinentes considerações no exame de qualificação.

Ao **Prof. Dr. Luis Garcia Alonso**, à **Profa. Dra. Laurecir Gomes** e à **Profa. Dra. Maeli Dal Pai Silva** pelas considerações no exame de pré-banca e banca.

Aos **docentes do Departamento de Anatomia** pela contribuição dada para a minha formação e pelo conhecimento compartilhado nas disciplinas cursadas durante o mestrado.

À **Sra. Liliam Alves Senne Panagio** pela atenção e auxílio durante todo o mestrado.

Aos **Srs. Marco Aurélio Ribeiro de Paula** e **Norivaldo Celestino** pela disposição em ajudar durante a parte experimental deste trabalho.

À **Sra. Marlene Lima Francisco** pela manutenção e cuidados com os animais utilizados neste trabalho, e a **Sra. Ana Floriana Rodrigues** pela atenção e auxílio durante todo o mestrado.

Aos **Srs. Paulo Afonso Bernardes**, **Paulo Francisco dos Santos** e **Toni Donizeti dos Santos** pelo auxílio durante os estudos e aulas práticas.

À **todos os amigos e colegas** que mesmo distantes nunca me abandonaram.

“Não sei como pareço aos olhos do mundo, mas eu vejo-me como um menino que brincava na praia e se divertia em encontrar uma pedrinha mais lisa uma vez por outra, ou uma concha mais bonita do que de costume, enquanto o grande oceano da verdade se estendia totalmente inexplorado diante de mim.”

(Isaac Newton)

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas.....	ix
Resumo.....	x
Abstract.....	xi
1. Introdução.....	1
1.1 Distrofia muscular de Duchenne.....	1
1.2 Camundongos <i>mdx</i>	2
1.3 Distrofina e Complexo Distrofina-Glicoproteínas.....	4
1.4 Degeneração muscular no camundongo <i>mdx</i>	6
1.5 Íons cálcio e seus canais.....	7
1.6 Bloqueadores de canais de Ca^{2+}	10
2. Objetivos.....	12
3. Materiais e Métodos.....	13
3.1 Animais.....	13
3.2 Grupos experimentais e tratamento.....	13
3.3 Determinação de creatina quinase no plasma sanguíneo.....	14
3.4 Análise histopatológica.....	15
3.4.1 Marcação com o corante azul de Evans.....	15
3.4.2 Retirada e processamento dos músculos.....	16
3.4.3 Quantificação da degeneração e regeneração.....	17
3.4.4 Observação dos músculos.....	18
3.5 Determinação de cálcio total nos músculos.....	19
3.6 Quantificação das proteínas calsequestrina e β -dystroglicana.....	19
3.6.1 Anticorpos.....	19

3.6.2 Preparação de extrato total.....	20
3.6.3 Análise das proteínas por Western-blotting.....	20
3.7 Análise estatística.....	21
4. Resultados.....	22
4.1 Determinação da creatina quinase	22
4.2 Índice de degeneração e degeneração.....	23
4.2.1 Análise qualitativa.....	23
4.2.2 Análise quantitativa.....	25
4.3 Determinação de cálcio total nos músculos.....	27
4.4 Quantificação de calsequestrina.....	28
4.5 Quantificação de β -dístroglicana.....	29
5. Discussão.....	31
5.1 Níveis séricos de creatina quinase.....	31
5.2 Análise da mionecrose e determinação de cálcio total.....	32
5.3 Quantificação da calsequestrina.....	34
5.4 Quantificação de β -dístroglicana.....	36
6. Conclusão.....	38
7. Referências Bibliográficas.....	39
8. Artigo a ser submetido.....	50
9. Certificado – Comissão de Ética.....	74

ABREVIATURAS

AE	- Azul de Evans
β -DG	- Beta-distroglicana
Ca^{2+}	- Íons Cálcio
$[\text{Ca}^{2+}]_i$	- Concentração de Ca^{2+} intracelular citoplasmática
cCSQ	- Calsequestrina cardíaca
CDG	- Complexo Distrofina-Glicoproteínas (CDG)
CK	- Creatina quinase
CSQ	- Calsequestrina
DHPRs	- Canais voltagem-dependentes dihidropiridina
DMD	- Distrofia Muscular de Duchenne
HE	- Hematoxilina-eosina
Infl/Reg	- Área de Inflamação e Regeneração
<i>Mdx</i>	- Murine dystrophin X-linked
NC	- Núcleo central
NP	- Núcleo periférico
PBS	- Tampão fosfato salina
Reg	- Área de regeneração
RS	- Retículo sarcoplasmático
RyR	- Receptores rianodina
SAC	- Canal ativado por alongamento
sCSQ	- Calsequestrina esquelética
SERCA	- Bomba Ca^{2+} - ATPase do Retículo Sarcoplasmático
STN	- Esternomastóide
TA	- Tibial Anterior
TNF- α	- Fator de Necrose Tumoral α
TT	- Túbulos T

RESUMO

A ausência da distrofina em fibras musculares de camundongos *mdx* e na Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) provoca ruptura no sarcolema, aumento no influxo de cálcio e conseqüente degeneração muscular.

Neste trabalho verificamos os efeitos dos bloqueadores de canais de cálcio diltiazem e verapamil na degeneração/regeneração do músculo distrófico de camundongos *mdx*.

Camundongos *mdx* (n=32; 18 dias de vida pós-natal) receberam diariamente injeção intraperitoneal de diltiazem (n=16; 72 mg/kg) ou verapamil (n=16; 25 mg/kg) por 18 dias. Após este período os músculos esternomastóide, diafragma, tibial anterior e coração foram retirados. Animais *mdx* controle (n=16) foram injetados com solução salina. Ambas drogas diminuíram significativamente os níveis séricos de creatina quinase (*mdx* tratado com salina: 573 ± 245 U/l, animais tratado com diltiazem: $161 \pm 53^* \text{U/l}$ e animais tratados com verapamil: $217 \pm 57^* \text{U/l}$; média $\pm$ desvio padrão, $*p < 0,05$ comparados a animais tratados com salina, teste *t* de Student). A quantificação de cálcio total, por espectrômetro de emissão óptica em plasma, foi 173-475% maior em músculos do *mdx* comparado a músculos de animais controles não-distróficos C57Bl/10. Verapamil e diltiazem reduziram a concentração de cálcio total apenas no diafragma (diltiazem: 229 mg de cálcio/kg versus salina: 295mg de cálcio/kg; $p = 0,06$, teste *t* de Student) e no músculo cardíaco (diltiazem/verapamil: 10 mg de cálcio/kg versus salina: 16 mg de cálcio/kg; $p < 0,05$, teste *t* de Student).

Na análise histológica, o diltiazem diminui significativamente a degeneração muscular no diafragma (salina: 28% fibras com núcleo central e 7% fibras positivas ao Azul de Evans versus 12% fibras com núcleo central e 1% fibras positivas ao Azul de Evans; $p < 0,05$, teste *t* de Student). Encontramos um aumento significativo de calsequestrina e β -dystroglicana, pela técnica de Western blotting, em alguns músculos dos animais tratados com diltiazem e verapamil. O diltiazem aparenta ser o mais efetivo agente na proteção contra degeneração muscular, especialmente nos músculos mais afetados.

Nossos resultados indicam que bloqueadores de canais de cálcio protegem contra a degeneração muscular na ausência de distrofina e podem ser úteis para o melhor entendimento dos mecanismos envolvidos nas distrofinopatias.

ABSTRACT

The lack of dystrophin in dystrophin-deficient fibers of *mdx* mice and in Duchenne muscular dystrophy leads to sarcolemmal breakdown and enhanced calcium influx followed by muscle degeneration. In this work, we examined whether the calcium channel blockers diltiazem and verapamil could protect dystrophic muscles from degeneration/regeneration. *Mdx* mice (n=32; 18 days old) received daily intraperitoneal injections of diltiazem (n=16; 72 mg/kg body weight) or verapamil (n=16; 25 mg/kg body weight) for 18 days, after which the sternomastoid, diaphragm, tibialis anterior and cardiac muscles were removed. Control *mdx* mice (n=16) were injected with saline. Both drugs significantly decreased the blood levels of creatine kinase (saline-treated *mdx* mice: 573 ± 245 U/l, diltiazem-treated mice: $161 \pm 53^*$ U/l and verapamil-treated mice: $217 \pm 57^*$ U/l; mean $\pm$ S.E.M., $*p < 0.05$ vs. saline controls, Student's *t*-test). The total calcium content, measured by plasma emission spectrometry, was 173-475% greater in *mdx* muscles compared to control C57Bl/10 muscles. Verapamil and diltiazem reduced the total calcium content only in diaphragm (diltiazem-treated mice: 229 mg calcium/kg vs. saline-treated mice: 295 mg calcium/kg; $p = 0.06$, Student's *t*-test) and cardiac muscle (diltiazem/verapamil-treated mice: 10 mg calcium/kg vs. saline-treated mice: 16 mg calcium/kg; $p < 0.05$, Student's *t*-test). Histological analysis showed that diltiazem significantly attenuated muscle degeneration only in diaphragm muscle (28% central nucleated fibers and 7% Evans blue-positive fibers in saline-treated mice vs. 12% central nucleated fibers and 1% Evans blue-positive fibers in diltiazem-treated mice; $p < 0.05$, Student's *t*-test). Immunoblots showed a significant increase in the levels of calsequestrin and β -dystroglycan in some diltiazem- and verapamil-treated muscles. Diltiazem was more effective than verapamil in protecting against muscle degeneration in *mdx* mice, especially in the more affected muscles. These results indicate that calcium channel blockers protect against muscle degeneration in the absence of dystrophin. They also suggest that these drugs could be useful therapeutic alternatives in the treatment of Duchenne muscular dystrophy.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Distrofia Muscular de Duchenne

A Distrofia Muscular de Duchenne (DMD; CID 310200), descrita em 1861, é considerada a mais comum e devastadora das distrofias musculares humanas, afetando uma em cada 3500 crianças do sexo masculino nascidas vivas. É caracterizada por fraqueza muscular progressiva seguida por perda de função e óbito por comprometimento cardio-respiratório em torno da segunda ou terceira década de vida (ENGEL et al., 1994; PETROF, 1998; BIGGAR et al., 2006).

A DMD é uma doença recessiva ligada ao cromossomo X, sendo mais freqüente em pessoas do sexo masculino. A anormalidade genética está na seqüência de nucleotídeos responsável pela expressão da proteína distrofina. Aproximadamente 30% dos casos originam-se de mutação espontânea, sendo o restante dos casos herdados do genótipo materno. Devido ao tamanho e complexidade do gene, a freqüência de mutação, deleções ou duplicações é elevada (TINSLEY et al., 1994). Isso resulta na leitura errada e/ou parada prematura da transcrição gênica e codificação anormal da proteína, tornando-a instável e facilmente degradada por proteases endógenas (SEIXAS et al., 1997).

A distrofina está associada a glicoproteínas, formando o complexo distrofina-glicoproteínas (CDG), que atravessa o sarcolema e estabelece conexão do citoesqueleto intracelular com a matriz extracelular da fibra muscular (BROWM; DPHIL et al., 1997; PETROF, 2002; SPENCER; MELLGREN, 2002). A ausência da distrofina prejudica esta conexão, promovendo desorganização dos componentes do CDG e instabilidade do sarcolema durante os ciclos de contração e relaxamento, levando a lesão do sarcolema e degeneração da miofibrila (GROUNDS et al., 2005a).

Em pacientes com DMD, a análise histológica da biópsia muscular revela fibras em degeneração, freqüentemente agrupadas, e presença de infiltrado inflamatório com macrófagos e linfócitos. Pequenas fibras imaturas de núcleo central também são observadas, refletindo a regeneração muscular por células satélites (SCHMALBRUCH, 1984; McDOWALL et al., 1990). As células satélites, localizadas entre a lâmina basal e o sarcolema, são responsáveis pelo crescimento e regeneração muscular na vida pós-natal. Entretanto, células satélites distróficas produzem fibras musculares sem distrofina propensas à degeneração. Posteriormente, a capacidade de regeneração por células satélites diminui e as fibras musculares são substituídas por tecido conjuntivo e adiposo (HOLTERMAN; RUDNICKI, 2005), o que justifica a perda da função muscular observada nesses pacientes.

1.2 Camundongos *mdx*

Até o final da década de 80, o estudo da DMD estava restrito às análises de biópsias ou ao cultivo de células, sendo impossível a observação experimental controlada da degeneração muscular. Nesse período, surge uma linhagem de camundongos mutantes originados da linhagem C57BL/10 ScSn, denominada C57BL/10 *mdx*: “x chromosome-linked muscular dystrophy” (BULFIELD et al., 1984). Estudos genéticos demonstraram que nos camundongos *mdx* o gene afetado é homólogo ao dos pacientes com DMD (LEFAUCHER et al., 1995), apresentando também ausência de distrofina, tornando-o um valioso modelo para estudos da DMD. O camundongo *mdx* é o modelo animal preferido da DMD devido à larga disponibilidade e baixo custo de produção e manutenção (TANABE et al., 1986; HAMER et al., 2002; SASAOKA et al., 2003).

Embora o camundongo *mdx* apresente intenso infiltrado inflamatório nas áreas de mionecrose, difere da distrofia humana por não apresentar fibrose intensa e depósito de tecido

adiposo na maioria dos tecidos musculares esqueléticos (PASTERNAK et al., 1995). Machos e fêmeas são afetados e os músculos do *mdx* regeneram sucessivamente após necrose, pelo menos durante a fase adulta do animal.

Os primeiros sinais de degeneração e regeneração das fibras musculares nesses animais iniciam-se por volta dos 20 dias de vida pós-natal. Acredita-se que o início repentino da mionecrose observada nessa idade seja devido ao aumento da atividade muscular que ocorre neste período, que aumentaria a susceptibilidade das fibras musculares à lesão (TANABE et al., 1986; CULLEN; JARROS, 1988; DISATNIK et al., 1998).

Entre 35 a 90 dias de vida, a necrose atinge seu ápice e após 120 dias de idade, a incidência de fibras necróticas é reduzida (TANABE et al., 1986). Até os nove meses de idade nota-se heterogeneidade no diâmetro das fibras musculares, bem como aumento significativo do número de fibras com núcleo central (BRIGUET et al., 2004).

Após os 20 meses de vida, a capacidade de regeneração muscular decresce devido a diminuição gradual da quantidade e da capacidade de proliferação das células satélites (LUZ et al., 2002). Os animais começam a apresentar características patológicas semelhantes às observadas em humanos, com progressiva fraqueza motora e perda de fibras musculares, que são substituídas por tecido conjuntivo (LEFAUCHEUR et al., 1995).

Dependendo do músculo estudado, observam-se diferenças na evolução e na intensidade das lesões musculares (PASTORET; SEBILLE, 1995; RADLEY; GROUNDS, 2006; MARQUES et al., 2008). Diferente da maioria dos músculos do animal distrófico, o diafragma apresenta uma patologia severa com degeneração progressiva, similar a progressão da DMD em humanos. Acredita-se que esta diferença é causada pelo trabalho contínuo do músculo para a respiração (STEDMAN et al., 1991) e pela diminuição da capacidade de regeneração após dano muscular (MATECKI et al., 2004).

1.3 Distrofina e Complexo Distrofina-Glicoproteínas

A distrofina é uma proteína de massa molecular relativa de 427 kDa, encontrada principalmente na face citoplasmática do sarcolema. Sua molécula é formada por tripla hélice de 2700 aminoácidos codificados por 79 exons, que são comandados pela atuação de diversos promotores presentes em alguns tipos celulares, como as células musculares, as células da glia, as células de Purkinge e as células de Schwann. O promotor muscular para a distrofina é bastante ativo nos músculos esqueléticos e cardíacos (ENGEL et al., 1994).

Quanto à sua organização molecular, a distrofina apresenta a forma de um dímero antiparalelo dividido em quatro domínios: o primeiro relaciona-se com a α -actina; o segundo liga-se à espectrina; o terceiro à ancarina; o último a um complexo de proteínas extracelulares, tais como a β -dystroglicana (β -DG) e α 2-laminina (ENGEL et al., 1994).

O complexo distrofina-glicoproteínas (CDG, Figura 1) apresenta múltiplas subunidades que atravessam o sarcolema e conectam a matriz extracelular ao citoesqueleto de actina. Fazem parte deste complexo as dystroglicanas, as sintrofins, as sarcoglicanas e as dystrobrevins (para revisão ver RANDO, 2001; BIGGAR et al., 2002; LAPIDOS et al., 2004; MARQUES, 2004).

No modelo do CDG representado na figura 1, a α -dystroglicana está ligada ao sarcolema por interações com o complexo transmembrana constituído de β -DG e complexo de proteínas sarcoglicanas (IBRAGHIMOV-BESKROVNAYA et al., 1992). A cauda citoplasmática da β -DG liga-se a distrofina na região rica em cisteína pelo domínio WW e a α -dystroglicana liga-se aos componentes da matriz extracelular, em especial a agrina e laminina, para promover a ligação entre o citoesqueleto interno e a matriz extracelular (ERVASTI; CAMPBELL, 1993). As regiões N-terminal da distrofina associam-se ao citoesqueleto de actina, embora a região central também

possua propriedades de ligação a actina. Por fim, o domínio C-terminal interage com as distrobrevinas e as sintrofinas.

Sugere-se que o CDG confere estabilidade ao sarcolema durante a contração e relaxamento da fibra muscular (ENGEL et al., 1994), além de servir como sinalizador de processos intracelulares que levam a mecanismos de defesa, a regulação de processos vitais ou a morte da fibra muscular. As moléculas de sinalização associadas ao CDG incluem calmodulina, Grb2 e óxido nítrico sintase (NOS), para revisão ver Rando (2001), Gailly (2002) e Marques (2004).

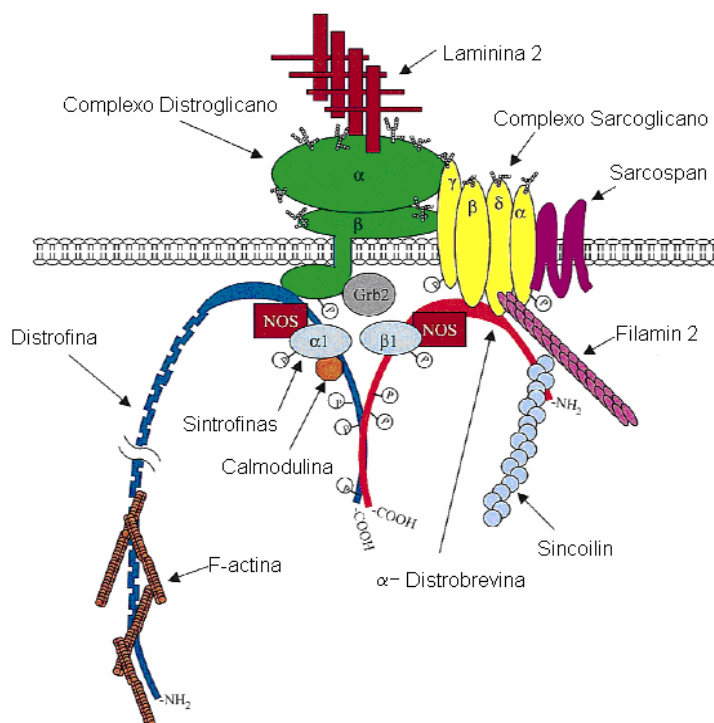


Figura 1: Organização molecular do complexo distrofina-glicoproteínas no sarcolema, incluindo os componentes integrais do complexo (distrofina, complexo distroglicano, complexo sarcoglicano, α -distrobrevina, sintrofinas e sarcospan), a ligação com a matriz extracelular (laminina 2), partes de ligação intracelular (F-actina, sincoilin e filamin 2) e moléculas de sinalização ligadas ao complexo (calmodulina, Grb2 e NOS). Adaptado de Rando, *Muscle & Nerve*, 24, p.1575-1594, 2001.

Mutações nos componentes deste complexo podem causar diferentes formas de distrofia muscular de herança autossômica. Em pacientes com DMD, os componentes do CDG estão

diminuídos ou ausentes no sarcolema quando comparados a músculos normais (ERVASTI et al., 1990), sugerindo que a distrofina é essencial para a correta formação do CDG.

O mecanismo pelo qual defeitos do CDG causam degeneração muscular permanece desconhecido. Acredita-se que a patogênese da DMD esteja relacionada à fragilidade do sarcolema, ao estresse mecânico e ao maior influxo de íons cálcio (Ca^{2+}) na fibra muscular resultante de disfunção de canais iônicos ou de descontinuidades do sarcolema das fibras distróficas, observadas ao microscópio eletrônico (MOKRI; ENGEL, 1975). Outros mecanismos podem estar relacionados a mionecrose, tais como sinalização celular alterada (RANDO, 2001), aumento do estresse oxidativo e participação de fatores inflamatórios liberados por neutrófilos, macrófagos e citocinas, como o fator de necrose tumoral α (TNF- α), para revisão ver Whitehead (2006).

1.4 Degeneração Muscular no Camundongo *mdx*

A ausência da distrofina e conseqüente desorganização do CDG é o evento inicial para a degeneração muscular. Esta desorganização favorece a fragilidade do sarcolema, com aumento das micro-rupturas transitórias que ocorrem pela força contrátil dos sarcômeros durante os ciclos de contração e relaxamento (PETROF et al., 1993, GROUNDS et al., 2005a). Rupturas transitórias da membrana plasmática são comuns em células sob estresse mecânico (para revisão ver McNEIL; STEINHARDT, 1997) e podem ser observadas pela perda de conteúdo intracelular da fibra muscular distrófica para o meio extracelular, como por exemplo da enzima creatina quinase (CK). A perda da integridade do sarcolema permite também o influxo de proteínas e íons para o meio intracelular, tais como albumina e íons cálcio (STRAUB et al., 1997; AMTHOR et al., 2004).

A distrofina também pode estar envolvida na agregação de canais iônicos da membrana e sua ausência pode levar a função anormal desses canais (FRANCO-OBREGON; LANSMAN, 1990). Sendo assim, a via inicial para entrada excessiva de Ca^{2+} no músculo *mdx* pode ser também através de canais iônicos.

O aumento na concentração de Ca^{2+} intracelular citoplasmática $[\text{Ca}^{2+}]_i$ leva a ativação de calpaínas, resultando em proteólise dos constituintes celulares; ativação de fosfolipase A_2 , afetando a integridade da membrana; aumento na produção de espécies reativas ao oxigênio, causando peroxidação lipídica; e aumento na concentração de Ca^{2+} na mitocôndria (Figura 2), para revisão ver Gissel (2005) e Whitehead et al. (2006).

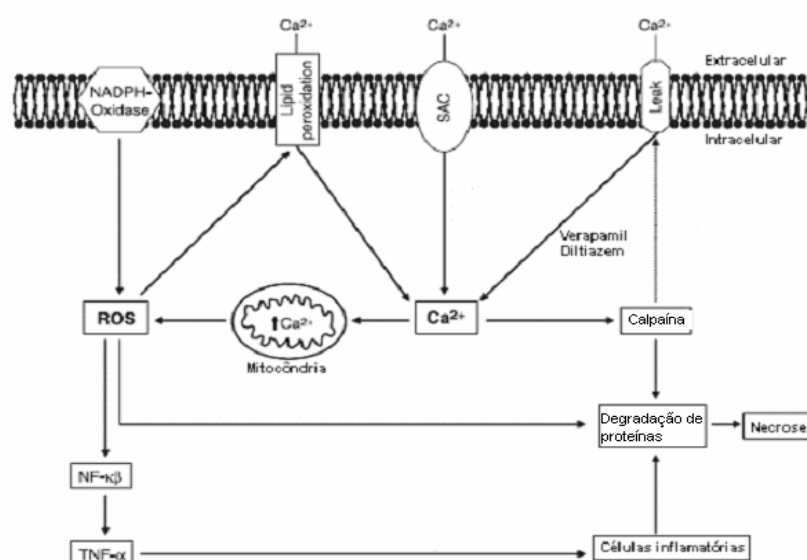


Figura 2: Esquema mostrando as possíveis vias de degeneração na fibra muscular distrófica, pelo aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e de espécies reativas ao oxigênio (ROS); detalhes descritos no texto. Diltiazem e verapamil, além de bloquear canais de cálcio tipo-L, também atuam em canal de cálcio *leak*. Adaptado de Whitehead, *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 33, p.657-662, 2006.

1.5 Íons cálcio e seus canais

O Ca^{2+} é um importante mensageiro intracelular que regula fenômenos celulares fisiológicos, como a contração-relaxamento da fibra muscular, e também desencadeia e participa de eventos patológicos que levam a injúria celular. A $[\text{Ca}^{2+}]_i$ é regulada pela interação de

múltiplos processos de influxo e efluxo (Figura 3). A $[Ca^{2+}]_i$ ocorre em ondas e picos, visto que altas concentrações por longos períodos são tóxicas para as células (BOOTMAN et al., 2001).

De maneira geral, as células mantêm baixas $[Ca^{2+}]_i$ livre, havendo alta concentração extracelular deste íon (ALBERTS et al., 2002; BOOTMAN et al., 2001). O gradiente de Ca^{2+} é mantido por canais presentes na membrana plasmática que movem ativamente o Ca^{2+} para fora da célula. Ou ainda, este íon pode ser resgatado para o retículo endoplasmático pela bomba Ca^{2+} -ATPase (ALBERTS et al., 2002).

Em fibras musculares distróficas é observada alteração na concentração do Ca^{2+} (TURNER et al., 1991), que se encontra elevada no citoplasma ou dentro de outros compartimentos celulares, como retículo sarcoplasmático e mitocôndria (MALLOUK et al., 2000; ROBERT et al., 2001).

A mobilização do Ca^{2+} (influxo, efluxo e estocagem intracelular) é realizada por canais voltagem-dependentes, os quais são operados por despolarização; canais de Ca^{2+} capacitativos, operados pela depleção de estoques intracelulares; e canais receptor-operados, que são ativados por mensageiros bioquímicos. Os canais iônicos possuem ligação estrutural a proteínas ligadas a membrana e contribuem para o trânsito anormal de Ca^{2+} em miócitos distróficos (FONG et al., 1990; FRANCO-OBREGON; LANSMAN, 1990; VANDEBROUCK et al., 2006).

Em resposta à despolarização do sarcolema, os canais voltagem-dependentes dihidropiridina (DHPRs) tipo-L, localizados na membrana dos túbulos transversos, permitem a entrada inicial do Ca^{2+} (Figura 3). O potencial de ação gerado pelos DHPRs ativa os receptores rianodina que liberam Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático para o sarcoplasma. O aumento da $[Ca^{2+}]_i$ leva a ativação de proteínas e conseqüente contração da fibra. O relaxamento ocorre em decorrência da diminuição $[Ca^{2+}]_i$ pelo bombeamento do Ca^{2+} para fora da fibra muscular e para

o retículo sarcoplasmático via bombas Ca^{2+} - ATPase da membrana plasmática e Ca^{2+} - ATPase do Retículo Sarcoplasmático (SERCA), para revisão ver Rossi e Dirksen (2006).

O Ca^{2+} bombeado para o retículo sarcoplasmático liga-se a calsequestrina (CSQ), principal proteína de tamponamento e estocagem de Ca^{2+} desta organela (Figura 3). Além disso, a CSQ parece regular a liberação do Ca^{2+} para fora do retículo sarcoplasmático através dos receptores rianodina controlando a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Rossi e Dirksen, 2006; Yano et al., 1994). Nos músculos distróficos, há decréscimo na capacidade da CSQ em se ligar ao Ca^{2+} (CULLIGAN et al., 2002).

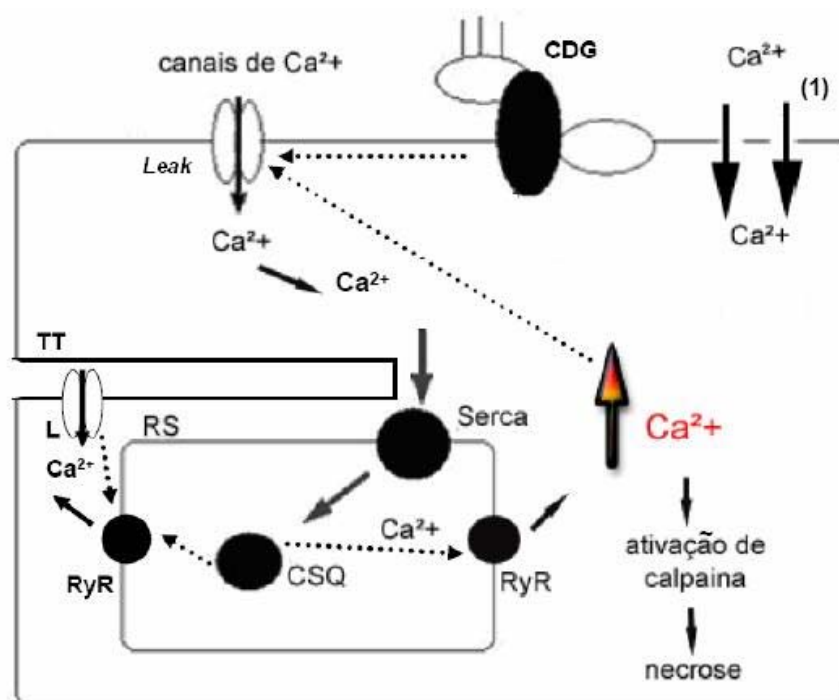


Figura 3: Diagrama esquemático da regulação de íons cálcio (Ca^{2+}) intracelular em uma fibra muscular esquelética distrófica. As **setas contínuas** indicam a movimentação de cálcio intracelular; as **setas pontilhadas** indicam vias de regulação do Ca^{2+} . Em resposta à despolarização do sarcolema, os canais de cálcio tipo-L (L), localizados nos túbulos T (TT) permitem a entrada de cálcio na fibra muscular e ativam os receptores rianodina (RyR) do retículo sarcoplasmático (RS), levando a um aumento $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e consequente contração muscular. O relaxamento ocorre em decorrência da diminuição da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ pelo bombeamento do Ca^{2+} para fora da fibra muscular e para o RS via bombas Ca^{2+} -ATPase da membrana plasmática e Ca^{2+} - ATPase do RS (Serca). O cálcio bombeado para o retículo sarcoplasmático liga-se a calsequestrina (CSQ), que parece regular a liberação do Ca^{2+} para fora do RS através dos RyR. Durante os ciclos de contração e relaxamento há um aumento das micro-rupturas transitórias da membrana plasmática (1), permitindo o influxo de Ca^{2+} para o meio intracelular. O aumento $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ativa proteases como a **calpaina**, que ativa os canais de Ca^{2+} do tipo **leak** e leva a um influxo contínuo de Ca^{2+} , com consequente aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e ativação de diferentes vias degenerativas, que levam a **mionecrose**. A ausência de distrofina no Complexo Distrofina-Glicoproteínas (CDG) pode levar a função anormal de canais do sarcolema. Adaptado de Pertille, *submetido*.

Outros canais podem estar envolvidos com o maior influxo de Ca^{2+} para o sarcoplasma, por exemplo o canal ativado por alongamento (SAC, stretch-activated channel). Antes de qualquer sinal de degeneração ou necrose muscular, as fibras musculares de camundongos *mdx* jovens apresentam um aumento na atividade destes canais (FRANCO-OBREGON; LANSMAN, 1994), sugerindo ser a fonte primária de Ca^{2+} nos músculo distrófico. A ocorrência destes canais é maior em fibras de *mdx* (VANDEBROUCK et al., 2002), levando a um aumento no influxo de Ca^{2+} e conseqüente aumento na $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

A $[\text{Ca}^{2+}]_i$ elevada ativa proteases como a calpaína, que ativa os canais de Ca^{2+} do tipo *leak* (ALDERTON; STEINHARDT, 2000a). A ativação de canais *leak* leva a um influxo contínuo de Ca^{2+} (FONG et al., 1990; TURNER et al., 1991; TURNER et al., 1993), com conseqüente aumento na $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e ativação de diferentes vias degenerativas, que levam a mionecrose. Isso pode resultar em um ciclo com *feedback* positivo de influxo de Ca^{2+} , proteólise dependente de Ca^{2+} e aumento de influxo de Ca^{2+} (para revisão ver BERCHTOLD et al., 2000; WHITEHEAD et al., 2006).

1.6 Bloqueadores de Canais de Ca^{2+}

Várias estratégias farmacológicas são utilizadas para minimizar a evolução da doença, prolongando e melhorando a qualidade de vida dos pacientes com DMD. Dentre elas podemos destacar o uso de antiinflamatórios, de bloqueadores de canais de Ca^{2+} , inibidores de proteases e drogas que agem no metabolismo de lipídios e proteínas (para revisão vide PORTER et al., 2002; RUEGG et al., 2002; IWATA et al., 2005).

Bloqueadores de canais de Ca^{2+} são drogas que inibem o aumento citossólico de Ca^{2+} , agindo sobre canais iônicos. Eles são representados por fármacos indicados no tratamento cardíaco e de hipertensão, como o diltiazem (benzotiazepina) e o verapamil (benzeneacetonitrila;

GILMAN et al., 1991, JANIS et al., 1987). Estudos sobre o efeito desses fármacos em músculo esquelético de animais experimentais distróficos por deficiência em sarcoglicanos (JOHNSON; BHATTACHARYA, 1993) e em retículo sarcoplasmático de músculos esqueléticos de animais normais (WANG et al., 1984; PAYDAR et al., 2005) demonstraram redução na taxa de transporte de cálcio para o sarcoplasma, contribuindo para a regulação da concentração de cálcio intracelular.

Vários estudos foram realizados com diltiazem para o tratamento de DMD. Não houve diferenças estatísticas que comprovassem a eficiência do tratamento, embora tenham sido observados alguns efeitos positivos do diltiazem (BERTORINI et al., 1988; PERNICE et al., 1988; LEFKOWITZ; LEFKOWITZ, 2005).

No músculo cardíaco, o diltiazem e o verapamil agem seletivamente nos canais voltagem-dependente tipo L (JANIS et al., 1987). No músculo esquelético, estes bloqueadores também agem nos canais de Ca^{2+} tipo *leak* voltagem-independente. O canal de Ca^{2+} tipo *leak* possui propriedades semelhantes a um canal operado por estoque, pois se abre em resposta a depleção de Ca^{2+} no retículo sarcoplasmático (POZZAN et al., 1994). O bloqueio destes canais impede o aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ que leva a mionecrose. Uma via de proteção indireta dos bloqueadores de canais de cálcio é pela regulação do $\text{TNF-}\alpha$, que ativa processos inflamatórios e pode levar a apoptose celular (LEFKOWITZ; LEFKOWITZ, 2005).

2. OBJETIVOS

Verificar os efeitos dos bloqueadores de canais de cálcio diltiazem e verapamil na degeneração/regeneração de fibras musculares distróficas de camundongos da linhagem *mdx*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos das linhagens C57BL/10ScCr/Uni e C57BL/10-mdx de ambos os sexos, obtidos a partir do acasalamento de animais mantidos no Biotério do Departamento de Anatomia do Instituto de Biologia, UNICAMP. As matrizes são oriundas do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB), UNICAMP. Após o nascimento, os filhotes permaneceram com a fêmea até o 21º dia de vida pós-natal.

Durante todo o experimento, os animais foram mantidos em caixas plásticas padrão em condições ambientais controladas (12 horas de ciclo claro/escuro) e com ração e água *ad libitum*.

Todos os experimentos foram realizados em acordo com as diretrizes para experimentação animal de nossa Instituição, sob o protocolo da Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEa-IB-UNICAMP) nº 1124-1.

3.2 Grupos Experimentais e Tratamento

Grupo controle: Composto por animais da linhagem C57BL/10ScCr/Uni (n=09). Este grupo tem por objetivo servir de comparativo aos demais grupos, por não apresentar ciclos de degeneração/regeneração da fibra muscular.

Grupo controle tratado: Composto por animais da linhagem C57BL/10ScCr/Uni (n=06). Este grupo tem por objetivo observar se o tratamento com os bloqueadores de canais de cálcio diltiazem (benzotiazepina – Sigma) e verapamil (benzeneacetonitrila – Sigma), do 18º ao 36º dia de vida pós-natal, “per se” altera o nível sérico de creatina quinase. Este grupo foi dividido em dois, de acordo com o bloqueador de canal de cálcio utilizado:

- **Controle diltiazem:** Grupo tratado com injeção intraperitoneal de diltiazem (n=03) diluído em solução fisiológica, 72mg/Kg (Iwata et al., 2005);
- **Controle verapamil:** Grupo tratado com injeção intraperitoneal de verapamil (n=03) diluído em solução fisiológica, 25 mg/Kg (Iwata et al., 2005).

Grupo *mdx*: Composto por animais da linhagem *mdx* (n=16), que receberam injeção intraperitoneal de solução fisiológica 0,9%, do 18º ao 36º dia de vida pós-natal. Este grupo tem por objetivo observar a degeneração/regeneração da fibra muscular distrófica em camundongos não tratados.

Grupo *mdx* tratado: Composto por animais da linhagem *mdx* (n=32), com tratamento do 18º ao 36º dia de vida pós-natal. Este grupo tem por objetivo observar a ação do tratamento com os bloqueadores de canais de cálcio diltiazem e verapamil, em camundongos *mdx*. Este grupo foi subdividido em dois, de acordo com o bloqueador de canal de cálcio utilizado:

- **Diltiazem:** Grupo tratado diariamente com injeção intraperitoneal de diltiazem (n=16) diluído em solução fisiológica, 72mg/Kg (Iwata et al., 2005);
- **Verapamil:** Grupo tratado diariamente com injeção intraperitoneal de verapamil (n=16) diluído em solução fisiológica, 25 mg/Kg (Iwata et al., 2005).

3.3 Determinação de Creatina Quinase no plasma sanguíneo

Para observar a ação dos bloqueadores de canais de cálcio sobre a degeneração muscular, realizamos a quantificação de creatina quinase (CK) nos grupos *mdx* (n=5), diltiazem (n=5), verapamil (n=5). O sangue foi coletado por punção cardíaca sob anestesia com cloridrato de cetamina (130 mg/Kg) e cloridrato de xilazina (6,8 mg/Kg). Em seguida, o sangue foi centrifugado a 936 RCF (Força centrífuga relativa a aceleração da gravidade) e 4°C por 10

minutos. Utilizamos o kit para quantificação de CK – Bioclin. As absorbâncias das amostras foram lidas a 25°C utilizando-se espectrofotômetro UV com comprimento de onda de 340 nm e cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico.

Para verificar se possíveis alterações nos valores de CK nos animais tratados estariam diretamente relacionadas com a diminuição da mionecrose, realizamos análise de CK em camundongos controle (C57BL/10ScCr) tratados com solução fisiológica (n=3), diltiazem (n=3) e verapamil (n=3).

3.4 Análise Histopatológica

3.4.1 Marcação com o corante Azul de Evans

O corante azul de Evans (AE; tetrasodium diazo salt Evans blue dye; Sigma) é uma molécula impermeável à membrana plasmática, não penetrando em fibras musculares esqueléticas de camundongos normais. O corante liga-se a albumina sérica e penetra na fibra muscular quando a membrana não está íntegra. A marcação *in vivo* com este corante evidencia fibras com alteração de permeabilidade do sarcolema e fibras em degeneração, fornecendo informações sobre algumas características dinâmicas e estruturais de músculos esqueléticos normais e portadores de patologias (MATSUDA et al., 1995; MARQUES et al., 2007c).

Utilizamos uma solução 1% de AE (Sigma), em Tampão Fosfato Salina (PBS: 14g de fosfato de sódio monofásico, 4,3 de fosfato de potássio bibásico anidro, 72g de cloreto de sódio em 1L de água destilada, pH 7,5), injetada intraperitonealmente na concentração de 0,1mL de solução por 10g de peso do animal (MATSUDA et al., 1995; HAMER et al., 2002; MARQUES et al., 2007c). Após 12 horas da injeção os animais foram sacrificados.

3.4.2 Retirada e Processamento dos Músculos

Os músculos dos animais *mdx* (n=5), dos *mdx* tratados com diltiazem (n=5) e dos *mdx* tratados com verapamil (n=5) foram processados segundo metodologia descrita por Straub et al. (1997) para verificação de alterações de permeabilidade no sarcolema.

Os animais foram sacrificados com anestesia intraperitoneal de cloridrato de cetamina (130 mg/Kg) e cloridrato de xilazina (6,8 mg/Kg). Os músculos esternomastóide (STN), tibial anterior (TA), diafragma e coração foram retirados e mantidos em solução fisiológica durante todo o procedimento. Cada músculo STN foi envolvido em um hemi-diafragma, para permitir seu posicionamento vertical no suporte de congelamento.

Para o congelamento os músculos foram fixados em suporte de madeira com tragacanth gum, imersos em n-hexano (J.T. Baker) por 45 segundos e imediatamente colocados em nitrogênio líquido à -159°C. Os músculos foram então retirados do nitrogênio e mantidos no Biofreezer à -70°C.

Para obtenção de cortes em criostato (Microm-HS505E), os músculos foram descongelados até -23°C e seccionados transversalmente na espessura de 7µm. Foram colocados quatro cortes por lâmina. Uma lâmina foi utilizada para coloração com hematoxilina-eosina ou tricrômico de Masson, outra para análise do AE.

As lâminas para análise da integridade do sarcolema, por meio do AE, foram incubadas por 15 minutos com acetona à -20°C e montadas em meio para fluorescência DABCO (Sigma).

Para a análise da regeneração muscular foi realizada coloração de hematoxilina-eosina (HE). As lâminas foram imersas em solução de hematoxilina de Harris por 30 segundos em temperatura ambiente, lavadas em água corrente por dez minutos e imersas em solução de eosina

por 15 segundos, sendo retirado o excesso de eosina em água corrente. As lâminas foram desidratadas em seqüência de álcoois e xilol e montadas em meio de montagem entellan (Merck).

Para a análise da área de fibrose no coração foi realizada coloração de tricrômico de Masson. As lâminas foram imersas em fixador Bouin por 3 horas, incubadas em álcool 70% por 12h e lavadas em água corrente por 10 minutos. Em seguida, as lâminas foram coradas com hematoxilina de Harris por 5 minutos, lavadas em água corrente por 10 minutos e imersas em solução-filha de Masson por 15 minutos. As lâminas foram banhadas em solução aquosa de ácido acético a 0,2% por três vezes, mergulhadas em solução de azofloxina por 5 minutos, e incubadas em solução de verde-luz por 10 minutos. Após banhar as lâminas em solução aquosa de ácido acético a 0,2%, elas foram desidratadas em seqüência de álcoois e xilol e montadas em meio de montagem entellan (Merck).

3.4.3 Quantificação da degeneração e regeneração

O processo de alteração de permeabilidade e degeneração muscular foi medido pela quantificação de fibras marcadas com AE. A regeneração muscular foi medida pelo número de fibras com núcleo central e pela medição da área de inflamação/regeneração e área de regeneração.

Para as lâminas coradas com HE, bem como para as montadas para análise do AE, dois cortes aleatórios de cada lâmina foram escolhidos para que ao final se obtivesse o número total de fibras musculares, o número e a porcentagem de fibras com núcleo central e de fibras marcadas com AE. Para o músculo diafragma foram escolhidos cinco campos aleatórios de cada corte para a quantificação da porcentagem de fibras com núcleo central e núcleo periférico.

Foram obtidos também a porcentagem da área total do músculo em processo inicial de regeneração associado ao infiltrado inflamatório (% Infl/Reg) e a porcentagem da área total do músculo em processo avançado de regeneração (% Reg).

As áreas de inflamação e regeneração foram caracterizadas por apresentar intenso infiltrado inflamatório e fibras em estágio inicial de regeneração (Figura 5C-F). Essas fibras possuem pequeno diâmetro, citoplasma escasso fortemente basófilo e núcleo central. As áreas de regeneração apresentam fibras em estágio avançado de regeneração com citoplasma basófilo, núcleo central, aumento aparente da proporção citoplasma/núcleo, menor diâmetro quando comparadas a células com núcleo central (NC) e núcleo periférico (NP) e escassa quantidade de infiltrado inflamatório ao seu redor (GROUNDS; TORRISI, 2004; GROUNDS et al., 2005b, MARQUES et al., 2008).

Para o músculo cardíaco foi observada a marcação com AE e obtida a porcentagem da área de fibrose com a coloração de tricrômico de Masson.

3.4.4 Observação dos músculos

As lâminas com coloração de HE e tricrômico de Masson foram observadas ao microscópio de luz binocular (Carl Zeiss), acoplado a uma objetiva com retículo quadrilátero com 100 pontos. Para a quantificação das fibras musculares utilizamos um contador manual. Para medição das áreas foram adquiridas imagens através de vídeo câmera (Nikon Express Series) acoplada ao microscópio de luz (Nikon Eclipse E 400) com objetiva de 20X e conectado a um computador com software Image Pro-Express.

A observação das lâminas coradas com AE foi feita em microscópio óptico de fluorescência (Nikon Express Series). O microscópio de fluorescência está acoplado a vídeo câmera (Hamamatsu C2400) para captação de imagens.

3.5 Determinação de cálcio total nos músculos

Para observar os efeitos do diltiazem e do verapamil na quantidade de cálcio total das fibras musculares realizamos a dosagem deste íon através de espectrometria de plasma. Foram utilizados três animais de cada grupo: controle, *mdx*, diltiazem e verapamil.

Os músculos STN, TA, diafragma e coração foram retirados como descrito previamente e pesados em balança analítica. Para o preparo das amostras, utilizamos a técnica descrita por Yoshida e colaboradores (2006). Os músculos foram colocados em balão volumétrico contendo 2% de seu volume de ácido nítrico p.a. a 100°C até a digestão total dos músculos. O balão volumétrico foi completado com água ultra-pura e a amostra filtrada com algodão em um funil. A análise da amostra foi realizada no espectrômetro de emissão ótica em plasma com acoplamento indutivo (ICP_OES; Optimum 3000 Duo View. Pekin-Elmer). Neste aparelho, o plasma gerado excita a amostra, que passa a emitir um espectro característico dispersado pela grade de difração.

3.6 Quantificação das proteínas Calsequestrina e β -dystroglicana por western blotting

Para verificar se o tratamento com diltiazem e verapamil altera proteínas reguladoras de cálcio e proteínas do CDG foi realizada a técnica de western-blotting para quantificação da calsequestrina esquelética (sCSQ, 72 kDa), da calsequestrina cardíaca (cCSQ, 55kDa) e da β -DG (43 kDa). Foram utilizados os músculos esternomastóide, tibial anterior, diafragma e coração de três animais de cada grupo: controle, *mdx*, diltiazem e verapamil.

3.6.1 Anticorpos

- **Anticorpos primários:** calsequestrina esquelética (VIIIID 12) e calsequestrina cardíaca (PA1-913) - Affinity BioReagents; beta-dystroglicana: NCL-b-DG - Novocastra Laboratories.

- **Anticorpos secundários:** Goat anti-mouse-IgG e Goat anti-rabbit-IgG; Peroxidase - Kirkegaard e Perry Laboratories.

3.6.2 Preparação de Extrato Total

Após sinais de anestesia, o animal foi perfundido com PBS e os músculos STN, TA, diafragma e coração foram retirados. Os músculos foram cortados em pequenos pedaços e homogeneizados imediatamente em tampão Tris-HCl 100mM pH 7,4 contendo Triton X-100 1%, pirofosfato de sódio 100mM, fluoreto de sódio 100mM, ETDA 10mM, ortovanadato de sódio 10 mM, PMSF 2 mM e 0,1mg/mL de aprotinina, a 4°C com homogeneizador do tipo Polytron PTA 20S (PT 10/35; Brinkmann Instruments) operado em velocidade máxima por 30 segundos. Os extratos foram centrifugados a 12581 RCF a 4°C por 20 minutos e o sobrenadante utilizado para análise por extrato total. A determinação de proteína foi realizada pelo método de Bradford (1976).

3.6.3 Análise das proteínas por western-blotting

As amostras do extrato protéico foram tratadas com tampão fosfato de sódio 1 M pH 7,0, contendo azul de bromofenol 0,1%, glicerol 50% e SDS 10% e ditioneitol 100mM (LAEMMLI, 1970), aquecidas a 100°C por 5 minutos em banho seco. Em seguida, 30 µg ou 60µg de proteína foram aplicados em gel SDS-poliacrilamida (12% para β-DG e 10% para CSQ) em aparelho para eletroforese da Bio-Rad (mini-Protean, Bio-Rad). A eletrotransferência do gel para a membrana de nitrocelulose foi realizada em 90 minutos a 120V (constante) em aparelho de transferência da Bio-Rad. As membranas foram incubadas com solução basal (Tris 10mM, contendo cloreto de sódio 150mM, Tween-20 0,02% e 5% de leite desnatado), por 1 hora em temperatura ambiente

para reduzir a ligação inespecífica de proteínas. Posteriormente, foram incubadas com anticorpo primário (1:1000) diluído em solução basal contendo 3% de leite desnatado em temperatura ambiente, *overnight*, em agitador mecânico (ROCKER II, Boekel Scientific). No dia seguinte, as membranas foram lavadas por 30 minutos com solução basal e incubadas com anticorpo secundário (1:2500) diluído em solução basal contendo 3% de leite desnatado por 90 minutos em temperatura ambiente. Posteriormente, as membranas foram novamente lavadas por 30 minutos com solução basal.

Para detectar as bandas imunorreativas, as membranas foram expostas à solução de quimioluminescência (Super Signal West Pico Chemiluminescent, Pierce) por 5 minutos, seguido de exposição a um filme Kodak XAR (Eastman Kodak, Rochester). As densidades das bandas das amostras sobre o filme foram escaneadas e, posteriormente, realizada a quantificação da densitometria em pixels usando o programa Image J 1.37v (National Institutes of Health, EUA).

3.7 Análise Estatística

A análise estatística dos dados foi feita pela aplicação do test-t de *Student*, com significância $p \leq 0,05$, entre os grupos experimentais avaliados.

4. RESULTADOS

4.1 Determinação da Creatina Quinase (CK)

Os valores de CK dos animais tratados com diltiazem ($p=0,033^*$; teste t de Student) e verapamil ($p=0,047^*$; teste t de Student) foram 72% e 62% menores quando comparados ao *mdx* (Tabela 1). Houve também diferença significativa entre os grupos tratados com solução fisiológica controle e *mdx*.

	média $\pm$ dp
controle	75,55 $\pm$ 43,90
mdx	573,13 ^a $\pm$ 245,21
diltiazem	161,36 ^b $\pm$ 53,47
verapamil	216,95 ^b $\pm$ 57,00

Tabela 1: Quantificação de CK (U/L) em camundongos *mdx* de 36 dias, com injeção i.p. de solução fisiológica (controle e *mdx*) e de bloqueadores de canais de cálcio, *diltiazem* e *verapamil*. Média $\pm$ desvio padrão (dp). Diferença significativa ($p \leq 0,05$, Teste t de *student*) entre os grupos controle e *mdx* (a), e entre os grupos *mdx* e tratados com bloqueadores de canais de cálcio (b).

Realizamos também a análise de CK em camundongos controle (C57BL/10) tratados com diltiazem e verapamil (Tabela 2), para verificar se a diminuição nos valores de CK, observada nos animais tratados com bloqueadores de canais de cálcio, está diretamente relacionada com a diminuição da mionecrose. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os grupos tratados controle diltiazem ($p=0,23$) e controle verapamil ($p=0,38$) quando comparados ao grupo controle, que recebeu injeção intraperitoneal de solução fisiológica. Este resultado mostra que a diminuição dos valores de CK nos *mdx* tratados com diltiazem e verapamil é consequência da redução da mionecrose.

	média $\pm$ dp
controle	75,55 $\pm$ 43,90
controle diltiazem	103,47 $\pm$ 5,63
controle verapamil	108,83 $\pm$ 139,75

Tabela 2: Quantificação de CK (U/L) em camundongos controle de 36 dias, com injeção i.p. de solução fisiológica (controle) e de bloqueadores de canais de cálcio, controle *diltiazem* e controle *verapamil*. Média $\pm$ desvio padrão (dp). Não houve diferença significativa ($p > 0,05$; Teste t de *Student*) entre os grupos.

4.2 Índice de Degeneração e Regeneração

4.2.1 Análise qualitativa

Os músculos STN, TA e diafragma dos grupos controle, *mdx*, diltiazem e verapamil apresentaram fibras musculares com diferentes características histológicas. Foram observadas fibras em processo de degeneração, fibras com núcleo periférico, fibras em diferentes estágios de regeneração e fibras completamente regeneradas (Figura 5).

As fibras com alteração de permeabilidade ou em degeneração foram evidenciadas pela presença de azul de Evans no seu interior (Figura 5A). As fibras com núcleo periférico apresentaram formato poligonal em justaposição com outras fibras de mesma característica (Figura 5B). Fibras regeneradas foram caracterizadas pelo núcleo centralizado, cromatina condensada, citoplasma eosinófilo e diâmetro próximo ao de uma fibra muscular esquelética com núcleo periférico (Figura 5B).

As fibras musculares em regeneração foram classificadas em dois estágios, de acordo com as suas características morfológicas e a celularidade local. Fibras no estágio inicial de regeneração foram caracterizadas por pequenos miócitos fortemente basófilos com núcleo central, entremeado por infiltrado inflamatório exuberante, em áreas de grande celularidade (Áreas de Inflamação/Regeneração) (Figura 5C e D). Fibras no estágio mais avançado de regeneração foram caracterizadas por citoplasma levemente basófilo, núcleo central, maior proporção de citoplasma em relação ao volume nuclear e diminuição aparente do infiltrado inflamatório, em áreas de menor celularidade (Áreas de Regeneração) (Figura 5E e F).

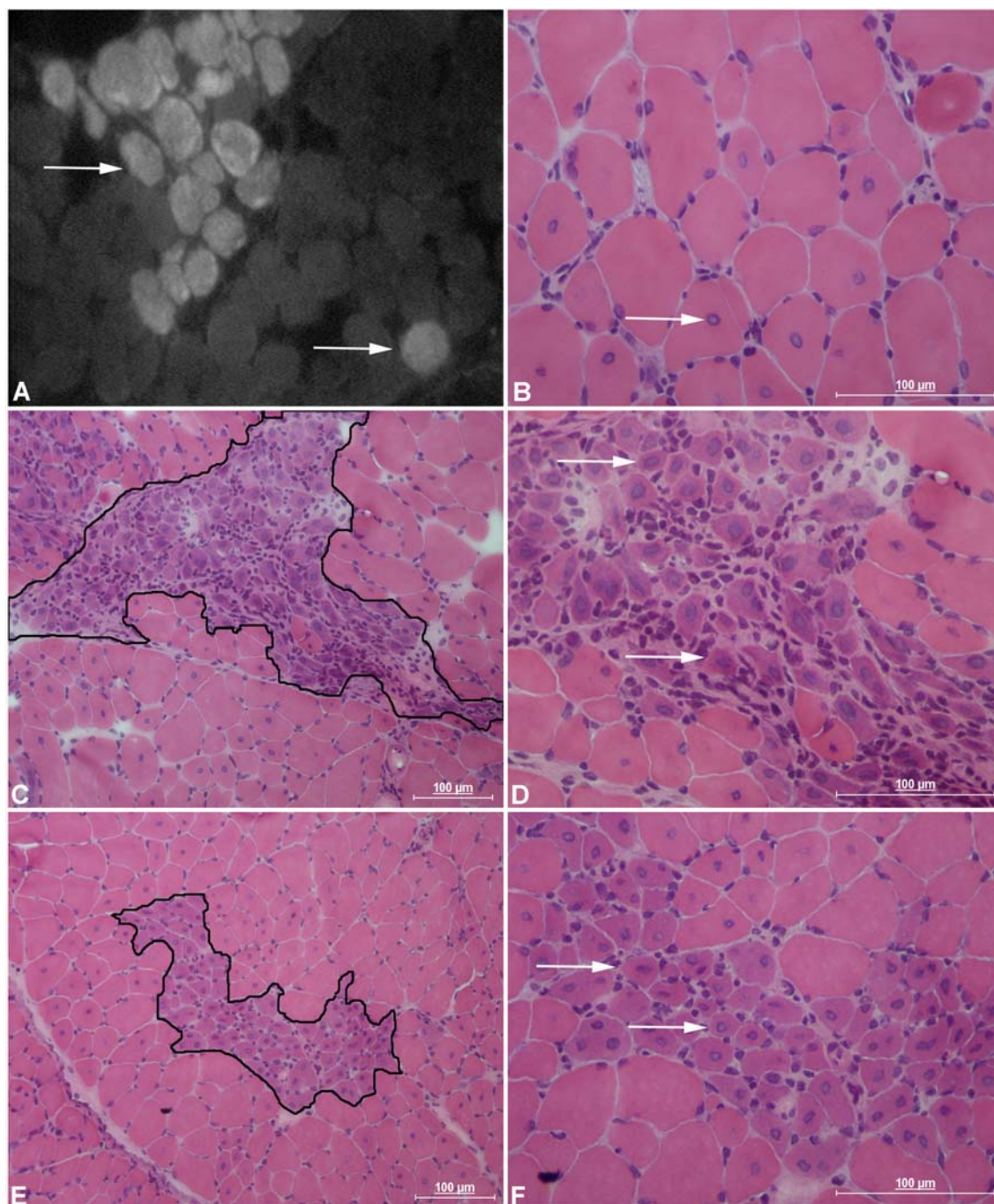


Figura 5: Secções transversais de músculos diafragma (A), tibial anterior (B) e esternomastóide (C-F) de camundongos *mdx* tratados com diltiazem (A) e verapamil (B-F). Em A, fibras com alteração na permeabilidade do sarcolema, positivas ao AE (setas) em microscopia de fluorescência (200X). Em B, fibras musculares com núcleo periférico de formato poligonal e fibras musculares regeneradas com contorno arredondado e núcleo centralizado (seta). Em C, área de inflamação e regeneração, mostrada em detalhes em D, com exuberante infiltrado inflamatório e fibras musculares em estágio inicial de regeneração (setas). Em E, área de regeneração, mostrada em detalhes em F, com fibras no estágio mais avançado de regeneração (setas). Coloração HE (B-F).

Os músculos cardíacos dos animais tratados com diltiazem e verapamil não apresentaram marcação positiva ao AE (Figura 6B).

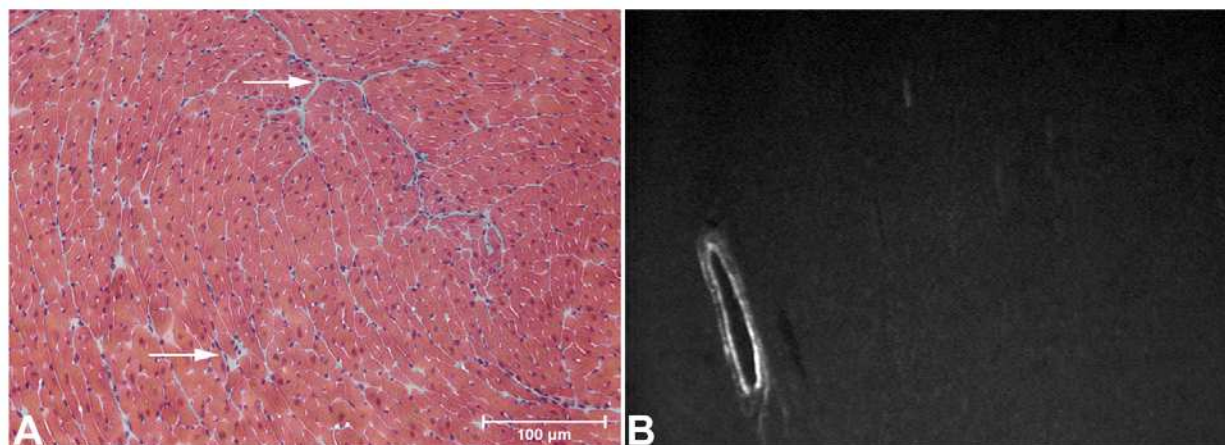


Figura 6: Secções transversais do músculo cardíaco de camundongos *mdx* tratados com diltiazem (A) e verapamil (B). Em A, fibras musculares cardíacas e áreas de fibrose (setas), coloração de tricrômico de Masson. Em B, fibras cardíacas sem alteração na permeabilidade do sarcolema, negativas ao AE, e um vaso sanguíneo marcado com AE em microscopia de fluorescência (200X).

4.2.2 Análise Quantitativa

Para análise quantitativa dos músculos esqueléticos foram utilizados os seguintes dados: número total de fibras musculares, porcentagem de fibras positivas ao AE, porcentagem de fibras com núcleo periférico (%NP), porcentagem de fibras com núcleo central (%NC), porcentagem da área de inflamação e regeneração (% Infl/Reg) e porcentagem da área de regeneração (% Reg).

Os resultados são observados nas Tabelas 1 e 2. Os músculos diafragma tratados com diltiazem apresentaram aumento na porcentagem de fibras com NP ($86,72 \pm 3,94$, média $\pm$ desvio padrão; $p=0,01^*$) e diminuição de fibras com NC ($12,19 \pm 3,34$; $p=0,01^*$) e marcadas com AE ($1,09 \pm 0,67$; $p=0,04^*$) quando comparados ao grupo *mdx* (NP = $71,98 \pm 9,29$; NC = $20,87 \pm 5,80$; e AE = $7,14 \pm 5,59$). O músculo diafragma do grupo verapamil não apresentou diferença significativa ($p>0,05$) quanto ao número de fibras com NC, NP e AE quando comparados ao *mdx*.

Os músculos STN e TA, dos grupos diltiazem e verapamil, também não apresentaram diferença significativa nestes itens quando comparados ao grupo *mdx* (Tabela 1).

		%NP	%NC	%AE	Total
STN	<i>mdx</i>	48,26 ± 11,22	50,73 ± 11,85	1,01 ± 2,45	828,80 ± 270,50
	diltiazem	53,81 ± 9,69	43,14 ± 10,42	3,05 ± 3,67	806,25 ± 149,32
	verapamil	43,58 ± 6,51	54,39 ± 7,68	2,03 ± 2,33	822,60 ± 161,92
TA	<i>mdx</i>	51,80 ± 10,17	46,43 ± 10,07	1,73 ± 2,88	1235,10 ± 389,13
	diltiazem	57,40 ± 8,37	40,99 ± 8,78	1,61 ± 2,97	1390,97 ± 327,79
	verapamil	53,80 ± 8,53	45,41 ± 8,46	0,79 ± 0,82	1405,15 ± 308,94
Diafragma	<i>mdx</i>	71,98 ± 9,29	20,87 ± 5,80	7,14 ± 5,59	6000 ± 0,00
	diltiazem	86,72* ± 3,94	12,19* ± 3,34	1,09* ± 0,67	6000 ± 0,00
	verapamil	79,90 ± 10,69	17,61 ± 10,70	2,49 ± 1,48	6000 ± 0,00

Tabela 1: Média ± desvio padrão das porcentagens de fibras com núcleo central (%NC), núcleo periférico (%NP) e fibras marcadas pelo azul de Evans (%AE), e do número total de fibras dos músculos distróficos esternomastóideo (STN), tibial anterior (TA) e diafragma dos grupos *mdx*, diltiazem e verapamil; (*) diferença significativa ($p \leq 0,05$, Teste t de *student*) entre os grupos *mdx* e diltiazem.

Os músculos TA tratados com diltiazem apresentaram aumento na porcentagem da área de inflamação/regeneração ($4,48 \pm 3,17$; $p=0,030^*$) e uma diminuição na área de regeneração ($0,06 \pm 0,13$; $p=0,040^*$), quando comparados ao mesmo músculo do grupo *mdx* (Infl/Reg = $1,18 \pm 1,17$ e Reg = $0,54 \pm 0,59$). Os músculos TA tratados com verapamil, assim como os músculos STN e diafragma tratados com diltiazem, não apresentaram diferença entre as áreas quando comparados ao *mdx* (Tabela 2).

		% Infl/Reg	% Reg
STN	<i>mdx</i>	3,26 ± 3,86	0,75 ± 1,11
	diltiazem	3,19 ± 1,55	1,18 ± 1,42
	verapamil	4,60 ± 3,13	1,71 ± 1,91
TA	<i>mdx</i>	1,67 ± 0,95	0,43 ± 0,57
	diltiazem	4,48* ± 3,71	0,06* ± 0,13
	verapamil	1,87 ± 1,61	0,72 ± 1,14
Diafragma	<i>mdx</i>	11,77 ± 4,45	2,39 ± 2,34
	diltiazem	6,06 ± 7,11	0,73 ± 0,83
	verapamil	13,55 ± 12,21	1,39 ± 2,43

Tabela 2: Médias ± desvios padrões das porcentagens da área de infiltrado inflamatório/regeneração (% Infl/Reg) e área de regeneração (% Reg) dos músculos distróficos esternomastóideo (STN), tibial anterior (TA) e diafragma dos grupos *mdx*, diltiazem e verapamil; (*) Diferença significativa ($p \leq 0,05$, Teste t de *student*) entre os grupos *mdx* e diltiazem.

No músculo cardíaco foi quantificada a área de fibrose (Figura 6A). Nesta análise os grupos tratados com bloqueadores de canais de cálcio não foram estatisticamente diferentes quando comparado ao grupo *mdx* (Tabela 3).

Coração	% de Fibrose
<i>mdx</i>	0,37 ± 0,42
diltiazem	0,20 ± 0,16
verapamil	0,23 ± 0,18

Tabela 3: Médias ± desvios padrões das porcentagens da área de fibrose dos músculos cardíacos distróficos dos grupos *mdx*, diltiazem e verapamil; Não houve diferença significativa ($p > 0,05$; Teste t de *student*) entre os grupos *mdx* e diltiazem ($p = 0,19$), e *mdx* e verapamil ($p = 0,27$).

4.3 Determinação de cálcio total nos músculos

Para observar a ação do diltiazem e do verapamil na quantidade de cálcio total das fibras musculares realizamos a dosagem deste íon e os resultados são observados na Figura 7. Houve aumento significativo ($p \leq 0,05$) de cálcio total no grupo *mdx* quando comparado ao controle em

todos os músculos (STN, TA, diafragma e coração), confirmando os dados da literatura (YOSHIDA et al. 2006).

Um aumento da concentração de cálcio total foi observado nos músculos STN e TA do grupo diltiazem e no músculo TA tratado com verapamil, quando comparados ao grupo *mdx*.

O coração apresentou diminuição de cálcio total nos grupos diltiazem e verapamil, quando comparados ao *mdx*. Não houve diferença significativa nos músculos diafragma do grupo diltiazem e verapamil e do STN do grupo verapamil, quando comparados ao grupo *mdx*.

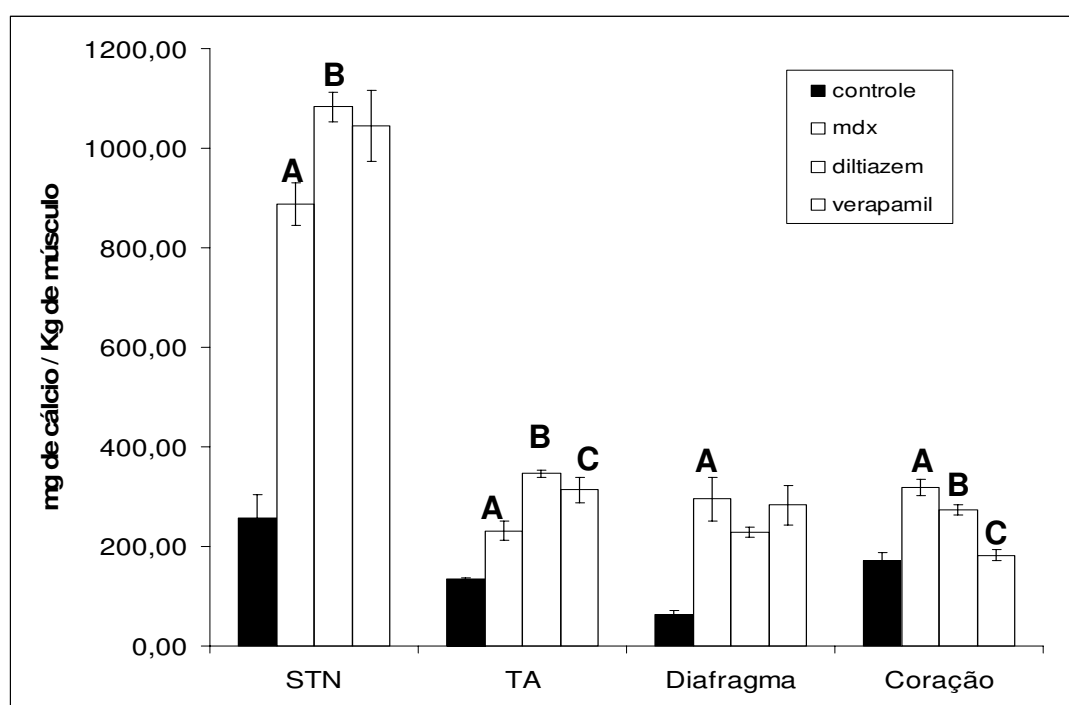


Figura 7: Média da quantificação de íons cálcio total nos músculos esternomastóide (STN), tibial anterior (TA), diafragma e coração em animais dos grupos controle (C57BL/10ScCr), *mdx* (C57BL/10-mdx), *mdx* tratado com diltiazem e *mdx* tratado com verapamil. Média $\pm$ desvio padrão (dp). Diferença significativa ($p \leq 0,05$, Teste t de student) entre os grupos controle e *mdx* (A), entre *mdx* e diltiazem (B) e entre *mdx* e verapamil (C).

4.4 Quantificação de Calsequestrina

Para verificar se o tratamento com bloqueadores de canais de cálcio altera os níveis da calsequestrina (esquelética e cardíaca) realizamos a técnica de western-blotting para estas proteínas. Os resultados estão apresentados na Figura 8.

No músculo TA houve um aumento de 20% da sCSQ no grupo diltiazem e de 24% no grupo verapamil (Figura 8B). Nos músculos STN (Figura 8A) e diafragma (Figura 8C) do grupo verapamil houve um aumento de 36 e 53%, respectivamente, em relação ao *mdx*. No coração não houve diferença entre os grupos controle, *mdx*, diltiazem e verapamil (Figura 8D).

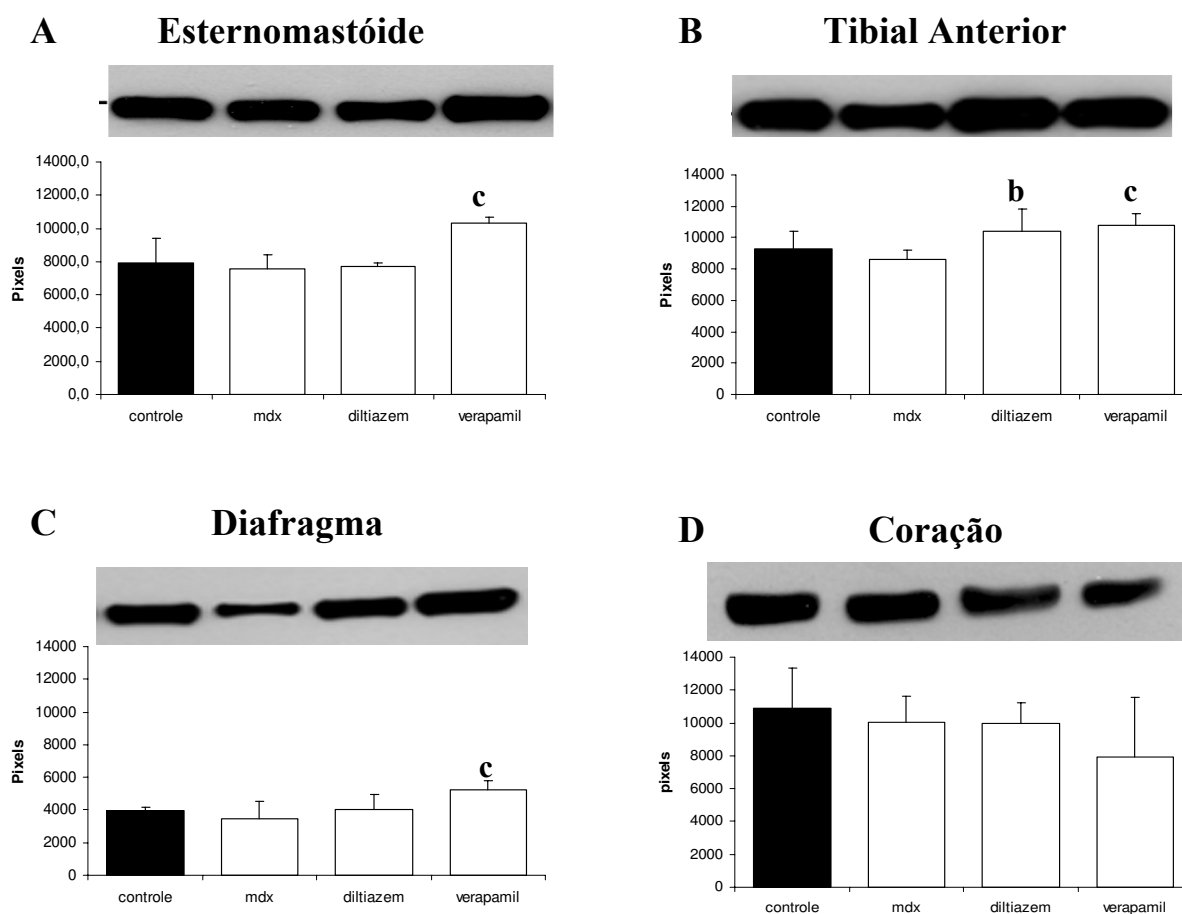


Figura 8: Análise por western-blotting da concentração de calsequestrina nos músculos esternomastóide (A), tibial anterior (B), diafragma (C) e coração (D) dos grupos controle, *mdx*, diltiazem e verapamil. Diferença significativa ($p \leq 0,05$; Teste *t* de *student*) entre os grupos *mdx* e diltiazem (b) e *mdx* e verapamil (c).

4.5 Quantificação de β -Distroglicana

Para verificar se o tratamento com bloqueadores de canais de cálcio altera os níveis da β -distroglicana realizamos a técnica de western-blotting para esta proteína. Os resultados estão apresentados na Figura 9.

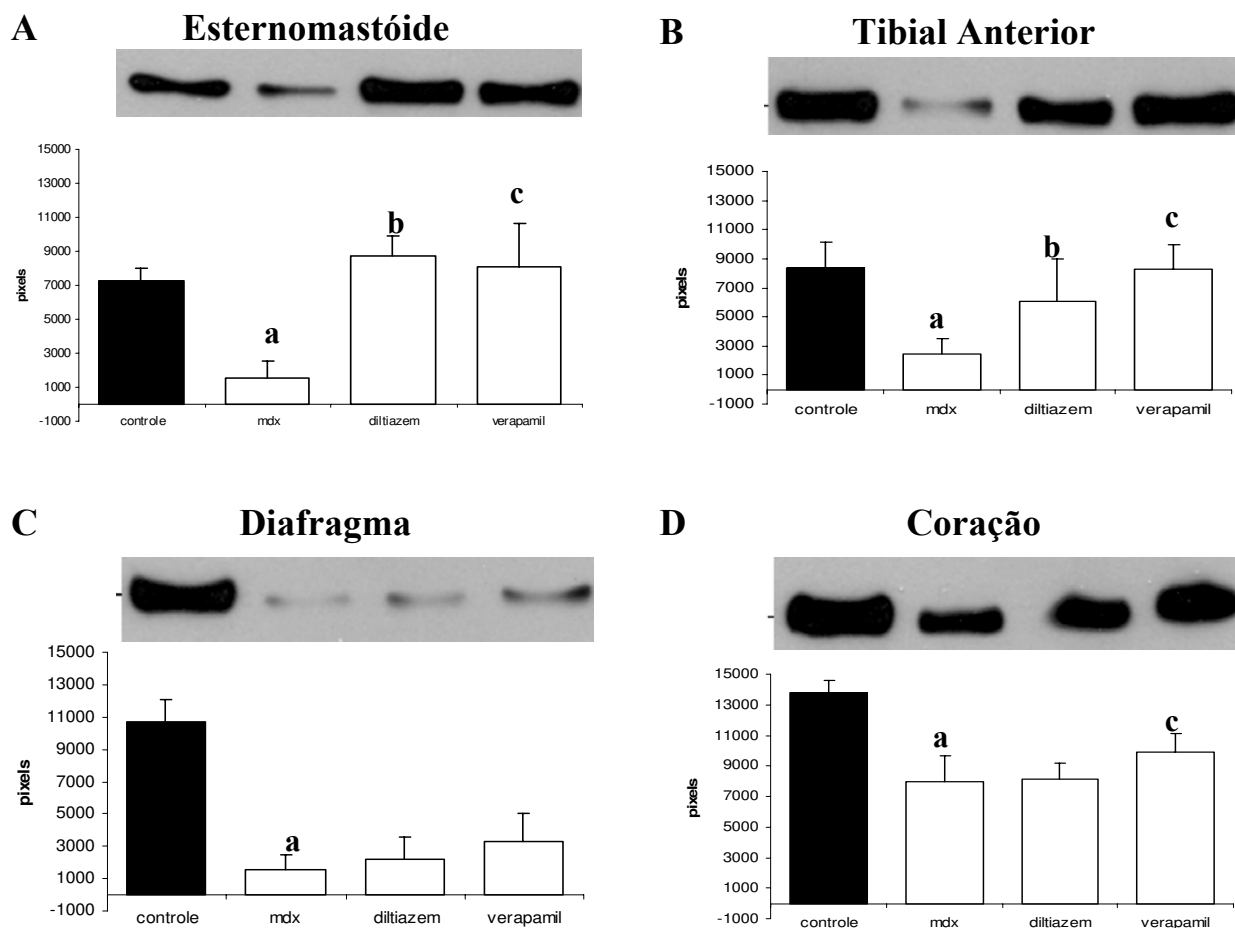


Figura 9: Análise por western-blotting da concentração de β -distroglicana nos músculos esternomastóide (A), tibial anterior (B), diafragma (C) e coração (D) dos grupos controle, *mdx*, diltiazem e verapamil. Diferença significativa ($p \leq 0,05$, Teste t de *student*) entre os grupos controle e *mdx* (a), *mdx* e diltiazem (b) e *mdx* e verapamil (c).

Todos os músculos distróficos estudados (STN, TA, diafragma e coração) apresentaram diminuição de 42 a 85% ($p \leq 0,05$) de β -distroglicana, quando comparados ao controle. Houve aumento de 472 e 430% desta proteína nos músculos STN e de 149 e 244% nos músculos TA tratados com diltiazem e verapamil. O músculo cardíaco também apresentou aumento de 24% quando tratado com verapamil (Figura 9).

5. DISCUSSÃO

5.1 Níveis Plasmáticos de Creatina Quinase

A creatina quinase (CK) é uma enzima que catalisa a transferência de um grupo fosfato entre a creatina fosfato e a adenosina difosfato (ADP). Os produtos desta reação são a creatina, que pode ser reaproveitada pela célula, e a adenosina trifosfato (ATP), que se encontra disponível para reações dependentes de energia na célula. O cérebro, os músculos liso, cardíaco e esquelético são as principais fontes teciduais de CK.

Os valores de CK no soro se alteram em várias condições clínicas associadas à lesão muscular aguda ou ao esforço muscular intenso. Os níveis de CK encontram-se altos após a realização de atividade física, de cirurgias e crises convulsivas, bem como em indivíduos portadores de doenças neuromusculares, como miosite e distrofia muscular (KATIRJI, 2001).

Embora seja um dos parâmetros mais indicados para o diagnóstico de lesões musculares, o nível sérico da CK pode apresentar considerável variação individual. Assim, os valores de CK devem servir apenas como uma análise complementar para o diagnóstico e acompanhamento da evolução das doenças neuromusculares.

Na DMD, a concentração de CK está 50 a 100 vezes acima dos limites superiores dos valores de referência (ENGEL et al., 1994). Em camundongos *mdx*, os níveis de CK também se mostram elevados durante toda a vida do animal (BULFIELD et al., 1984; YOSHIDA et al., 2006).

No presente trabalho, os animais dos grupos tratados com diltiazem e verapamil apresentaram diminuição nos valores de CK quando comparados ao *mdx*, sugerindo uma diminuição da degeneração muscular nesses grupos. Este dado é coerente com os resultados histológicos do músculo diafragma, em que o tratamento com diltiazem diminuiu as fibras positivas ao AE e aumentou o número de fibras com núcleo periférico (fibras que não sofreram

degeneração), quando comparados ao grupo *mdx*. Entretanto, os músculos STN e TA do grupo diltiazem, assim como os músculos STN, TA e diafragma do grupo verapamil foram iguais ao grupo *mdx* na porcentagem de fibras positivas ao AE e de NC. Isto sugere que possam existir diferenças na ação da droga dependendo do músculo analisado e da intensidade com que este músculo é afetado pela falta de distrofina.

Concluimos que a quantificação de CK não acompanha as alterações histológicas de cada músculo, pois os valores obtidos da CK são valores séricos totais, ou seja, expressam a necrose de todos os músculos esqueléticos.

5.2 Análise da Mionecrose e Determinação de Cálcio Total

Os bloqueadores de canais de cálcio são utilizados no tratamento da hipertensão arterial e doenças cardiovasculares desde meados da década de 1970. Têm ação nos canais de cálcio voltagem-dependentes tipo-L, nos canais *leak* operados por estoque e inibem o aumento de cálcio intracelular (JANIS et al., 1987; HOPF et al., 1996).

Estudos anteriores sugeriram que esses fármacos reduziram a taxa de transporte de Ca^{2+} para o sarcoplasma, contribuindo para a regulação da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ em músculo esquelético de animais distróficos por deficiência em sarcoglicanos (JOHNSON; BHATTACHARYA, 1993; IWATA et al., 2005) e em retículo sarcoplasmático de músculos esqueléticos de animais normais (WANG et al., 1984; PAYDAR et al., 2005).

A quantificação de íons cálcio livres no sarcoplasma pode ser realizada utilizando-se o marcador Fura-2 (TURNER et al., 1988), o FFP-18 (específico para a região sub-sarcolemal; Han et al., 2006), ou ainda o aequorin (cálcio estocado na mitocôndria; VANDEBROUCK et al., 2006). Estas técnicas permitiriam a análise mais precisa dos níveis do cálcio e poderiam ajudar a

elucidar os mecanismos de ação dos bloqueadores de canais de cálcio estudados no presente projeto.

No presente trabalho, realizamos a dosagem total deste íon em cada músculo, através de espectrometria de plasma, tal como descrito em trabalho anterior (YOSHIDA et al., 2006). A concentração de Ca^{2+} total nos músculos do grupo *mdx* está aumentada quando comparada ao controle (GLESBY et al., 1988; REEVE et al., 1997; YOSHIDA et al., 2006) e de pacientes com DMD (BERTORINI et al., 1982; JACKSON et al., 1985), quando comparados a músculos normais. O aumento da concentração de cálcio total de músculos *mdx* está associado ao período de necrose e retorna aos valores normais durante a fase de regeneração (REEVE et al., 1997).

No músculo diafragma do grupo diltiazem houve diminuição da concentração de cálcio total, embora não-significante, quando comparado ao grupo *mdx*. Enquanto, nos músculos STN e TA do grupo diltiazem e verapamil houve um aumento na concentração deste íon. Essa resposta diferenciada nos músculos deve estar relacionada a outras ações do diltiazem e verapamil, como a inibição de canais de Ca^{2+} tipo *leak* (HOPF et al., 1996) e a regulação do estoque de cálcio em compartimentos celulares (DEHPOUR et al., 1998).

O coração apresentou diminuição de cálcio total nos grupos diltiazem e verapamil, quando comparado ao *mdx*, sugerindo a ação do verapamil e do diltiazem nos canais de cálcio tipo-L. No coração, estes canais são ativados cerca de 10 a 100 vezes mais rápido do que nos músculos esqueléticos (ROSENBERG et al., 1986), o que pode justificar a diminuição significativa de cálcio total somente neste músculo. A diminuição de cálcio total também sugere que a concentração dos fármacos utilizada foi suficiente para bloquear os canais de cálcio. A análise histológica e de AE no coração mostrou que este músculo não sofre degeneração aos 36 dias de vida pós-natal. Estudos mostram que o músculo cardíaco de animais *mdx* de 2-3 meses de idade

não apresenta grande área de fibrose (WEHLING-HENRICKS et al., 2005; BOSTICK et al., 2008).

Observamos que nesta idade (36 dias), o músculo diafragma *mdx* passa por um pico de degeneração, com aumento significativo da porcentagem de fibras marcadas com AE comparada aos músculos STN e TA ($p \leq 0,05$). Isto pode justificar a ação protetora dos bloqueadores de canais de cálcio somente na degeneração deste músculo. De fato, diferenças na evolução e intensidade das lesões musculares são observadas de acordo com as funções do músculo estudado, por exemplo, envolvidos com movimento (TA, diafragma), postura (STN), músculos extra-oculares (MARQUES et al., 2007b) e laríngeos (MARQUES et al., 2007a).

5.3 Quantificação da Calsequestrina

Nos camundongos *mdx*, além da elevada $[Ca^{2+}]_i$, a capacidade de tamponamento deste íon pelo retículo sarcoplasmático também é prejudicada (CULLIGAN et al., 2002). Com o aumento dos níveis de Ca^{2+} livre no sarcoplasma e o não tamponamento pelo retículo, ocorre maior ativação de enzimas proteolíticas dependente de Ca^{2+} (ALDERTON; STEINHARDT, 2000a, 2000b; CULLIGAN; OHLENDIECK, 2002). Estudos recentes sugerem que, em parte, isso é causado por uma redução de sarcalumenina, a menor proteína ligada ao Ca^{2+} (DOWLING et al., 2004) e pela alteração na oligomerização da calsequestrina (DOWLING et al., 2003).

A calsequestrina é a principal proteína de estocagem de Ca^{2+} no RS de músculos esqueléticos. Acredita-se que a calsequestrina esteja localizada no lúmen do RS e não contém segmentos que atravessam a membrana. Há duas formas de calsequestrina: a esquelética e a cardíaca. A forma esquelética é expressa nas fibras esqueléticas de contração rápida e de

contração lenta e é ausente no coração (ARAI et al., 1992; BIRALD et al., 1992; DAMIANI; MARGRETH, 1994). A forma cardíaca é expressa somente nos músculos cardíacos e nos músculos esqueléticos de contração lenta (25% do total de calsequestrina) e não é observada em fibras de contração rápida. Vários estudos indicam que a calsequestrina está envolvida no processo de liberação de cálcio.

Nossos resultados verificaram que não há diferença na concentração de calsequestrina esquelética (sCSQ) entre os músculos normais e *mdx*. Estes dados estão de acordo com os estudos de Culligan e colaboradores (2002), que observaram redução nas proteínas semelhantes à calsequestrina CLP-150, CLP-170 e CLP-220 em *mdx*, mas não encontraram diferença entre a calsequestrina de músculos normais e *mdx*. A redução dessas proteínas pode prejudicar o processo de seqüestro de cálcio pelo RS.

Encontramos aumento da sCSQ nos músculos STN, TA e diafragma de animais tratados com verapamil e no músculo TA de animais tratados com diltiazem. Sugerimos que os bloqueadores de canais de Ca^{2+} podem, indiretamente, atuar no tamponamento do cálcio no retículo sarcoplasmático, pelo seguinte mecanismo: o bloqueio dos canais de cálcio do tipo-L leva a não-ativação de receptores rianodina (ISLAM et al., 2002; ROSSI; DIRKSEN, 2006), impedindo a saída do Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático para o sarcoplasma. Além de inibir o aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ pelo bloqueio de canais de cálcio tipo-L e *leak*, o diltiazem e o verapamil provocam um aumento na quantidade de Ca^{2+} armazenada dentro do RS. Esse aumento na concentração de Ca^{2+} pode levar ao aumento da quantidade de CSQ para tamponar o interior do RS. Além disso, diltiazem e verapamil parecem afetar a atividade da SERCA e os níveis de Ca^{2+} transportado para o RS de músculos esqueléticos e cardíacos (WANG et al., 1984).

Observamos também resultados diferenciados, de acordo com o músculo estudado, possivelmente dependendo do mecanismo de ação do fármaco e o estágio de degeneração-

regeneração que se encontra cada músculo. Estudos anteriores mostraram que os diferentes músculos distróficos apresentam variação quanto à intensidade e período do pico de degeneração (PASTORET; SEBILLE, 1995; MARQUES et al., 2008).

5.4 Quantificação de β -dystroglicana

A dystroglicana é uma proteína de membrana que liga a matriz extracelular a proteínas do citoesqueleto associado a distrofina. Acredita-se que essa proteína é essencial para a integridade e sobrevivência da fibra muscular durante os ciclos de contração e relaxamento. A dystroglicana, após sua transcrição, é quebrada em duas subunidades: α e β -dystroglicana (β -DG). A β -DG é uma proteína trans-sarcolemal e interage intracelularmente com a distrofina e com proteínas sinalizadoras, como Grb2 (COHN, 2005; BARRESI; CAMPBELL, 2006).

A concentração da β -DG apresentou-se diminuída no músculo STN, TA, diafragma e coração dos animais *mdx*, a mudanças na expressão das proteínas do CDG é consequência da ausência da distrofina no músculo distrófico (DOWLING et al., 2003; PERTILLE et al., *submetido*).

Os músculos STN, TA e coração tratados com bloqueadores de canal de cálcio apresentaram aumento na concentração de β -DG. O verapamil e o diltiazem dependendo da concentração podem exercer outras ações no sarcolema, além da sua atividade de bloqueio de canais de cálcio (WANG et al., 1984). Isso pode explicar a ação dos bloqueadores na elevação na concentração de β -DG nos músculos tratados.

Os músculos extra-oculares do *mdx*, que possuem proteção natural à mionecrose, apresentam uma concentração de β -DG igual ou aumentada em relação ao animal controle (DOWLING et al., 2003; PERTILLE et al., *submetido*). Uma das vias de regulação da entrada de cálcio para o sarcoplasma depende da associação entre canais SAC e α -sintrofina, um

componente do CDG que pode ancorar estes canais ao complexo distrofina (VANDEBROUCK et al. 2007). Na ausência da distrofina, a β -DG pode interagir com a utrofina, α -sintrofina ou outras proteínas subsarcolemas envolvidas na sinalização pelo cálcio, conferindo um melhor tamponamento da concentração de cálcio intracelular e conseqüente proteção a mionecrose (VANDEBROUCK et al. 2007, PERTILLE et al., *submetido*).

Entretanto, o aumento da β -DG pode não estar relacionada a proteção a mionecrose nos músculos distróficos, como no caso dos extra-oculares, pois os músculos STN e TA não apresentaram melhora nos parâmetros morfológicos, embora os níveis de CK estejam diminuídos.

6. CONCLUSÃO

Em conclusão, verificamos que os bloqueadores de canais de cálcio diltiazem e verapamil diminuem a mionecrose no modelo experimental de distrofia muscular, provavelmente por atuarem nos canais de cálcio tipo-L e do tipo *leak*, diminuindo a concentração de cálcio intracelular.

Os resultados mostram que o diltiazem e o verapamil apresentam efeitos secundários ao alterar proteínas do retículo sarcoplasmático (calsequestrina) e do complexo distrofina-glicoproteínas (β -dystroglicana). A utilização destas drogas contribui para o melhor entendimento dos mecanismos envolvidos nas distrofinopatias.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) NBR 6023

ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., RALFF, M., ROBERTS, K., WALTER, P. **Mol Biol Cell**. 4^aed., New York: Garland Science, p.1463, 2002.

ALDERTON, J.M., STEINHARDT, R.A. Calcium influx through calcium leak channels is responsible for the elevated levels of calcium-dependent proteolysis in dystrophic myotubes. **Biol Chem**. v.275, p.9452–9460, 2000a.

ALDERTON, J.M., STEINHARDT, R.A. How calcium influx through calcium leak channels is responsible for the elevated levels of calcium-dependent proteolysis in dystrophic myotubes. **Trends Cardiovasc Med**. v.10, p.268–272, 2000b.

AMTHOR, H., EGELHOF, T., MCKINNELL, I., LADD, M.E., JANSSEN, I., WEBER, J., SINN, H., SCHRENK, H-H., FORSTING, M., VOIT, T., STRAUB V. Albumin targeting of damaged muscle fibres in the mdx mouse can be monitored by MRI. **Neuromuscul Disord**. v.14, p.791-796, 2004.

ARAI, M., OTSU, K., MacLENNAN, D.H., PERIASAMY, M. Regulation of sarcoplasmic reticulum gene expression during cardiac and skeletal muscle development. **Am J Physiol Cell Physiol**. v.262, p.C614-C620, 1992.

BARRESI, R., CAMPBELL, K.P. Dystroglycan: from biosynthesis to pathogenesis of humam disease. **J Cell Sci**. v.119, p.199-207, 2006.

BERCHTOLD, M.W., BRINKMEIER, H., MUNTENER, M. Calcium ion in skeletal muscle: its crucial role for muscle function, plasticity, and disease. **Physiol Rev**. v.80(3), p.1215-1265, 2000.

BERTORINI, T.E., BHATTACHARYA, S.K., PALMIERI, G.M., CHESNEY, C.M., PIFER, D., BAKER, B. Muscle calcium and magnesium content in Duchenne muscular dystrophy. **Neurology**. v.32, p.1088-1092, 1982.

BERTORINI, T.E., PALMIERI, G.M.A., GRIFFIN, J.W., IGARASHI, M., McGEE, J., BROWN, R., NUTTING, D.F., HINTON, A.B., KARAS, J.G. Effect of chronic treatment with the calcium antagonist diltiazem in Duchene muscular dystrophy. **Neurology**. v.38, p.609-613, 1988.

BIGGAR, W.D., KLAMUT, H.J., DEMACIO, P.C., STEVENS, D.J., RAY, P.N. Duchenne Muscular Dystrophy: current knowledge, treatment and future prospects. **Clin Orthop Relat Res.** v.401, p.88-106, 2002.

BIGGAR, D.W. Duchenne Muscular Dystrophy. **Pediatr Rev.** v.401, p.83-88, 2006.

BIRALD, D., VOLPE, P., DAMIANI, E., MARGRETH, A. Coexistense of two calsequestrina isoforms in rabbit slow-twitch skeletal muscle fibers. **FEBS Lett.** v.299, p.175-178, 1992.

BOSTICK, B.; YUE, Y.; LONG, C.; DUAN, D. Prevention of dystrophin-deficient cardiomyopathy in twenty-one-month-old carrier mice by mosaic dystrophin expression or complementary dystrophin/utrophin expression. **Circ Res.** v.4/18, p.121-130, 2008.

BOOTMAN, M.D., COLLINS, T.J., PEPPIATT, C.M., PROTHERO, L.S., MACKENZIE, L., DE SMET, P., TRAVERS, M., TOVEYS, S.C., SEO, J.T., BERRIDGE, M.J., CICCOLINI, F., LIPP, P. Calcium signaling – an overview. **Semin Cell Dev Biol.** v. 12, p.3-10, 2001.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of mivcrogram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem.** v.72, p.248-254, 1976.

BRIGUET, A., COURDIER-FRUH, I., FOSTER, M., MEIER, T., MAGYAR, J.P. Histological parameters for the quantitative assessment of muscular dystrophy in the *mdx*-mouse. **Neuromuscul Disord.** v.14, p.675-682, 2004.

BROWN, R.H., DPHIL JR, M.D. Dystrophyn-associates proteins and the muscular dystrophies. **Annu Rev Med.** v.48, p.457-466, 1997.

BULFIELD, G., SILLER, W.G., WIGHT, P.A.L., MOORE, K.J. X chromosome-linked muscular dystrophy (*mdx*) in the mouse. **Proc Natl Acad Sci USA.** v.81, p.1189-1192, 1984.

COHN, R.D. Dystroglycan: important player in skeletal muscle and beyond. **Neuromuscul Disord.** v.15, p.207-217, 2005.

CULLEN, M.J., JARROS, E. Utrastrucuture of the muscle in the X-chromosome linked dystrophic (*mdx* mouse). Comparison with Duchenne muscular dystrophy. **Acta Neuropathol.** v.77, p.69-81, 1988.

CULLIGAN, K., BANVILLE, N., DOWLING, P., OHLENDIECK, K. Drastic reduction of calsequestrin-like proteins and impaired calcium binding in dystrophic mdx muscle. **J Appl Physiol.** v.92, p.435-445, 2002.

CULLIGAN, K., OHLENDIECK, K. Abnormal calcium handling in muscular dystrophy. **Basic Appl Myol.** v.12, p.147-157, 2002.

DAMIANI, E., MARGRETH, A. Characterization study of the ryanodine receptor and of calsequestrina isoforms of mammalian skeletal muscle in relation to fibre types. **J Muscle Res Cell Motil.** v.15, p.86-101, 1994.

DEHPOUR, A.R., MOUSAVIZADETH, K., GERAYESSH-NEJAD, S. Calcium release by diltiazem from isolated sarcoplasmic reticulum of rabbit skeletal muscle. **Gen Pharmacol.** v.31, p.463-468, 1998.

DISATNIK, M.H., DHAWAN, J., YU, Y., BEAL, M.F., WHIRL, M.M., FRANCO, A.A., RANDO, T.A. Evidence of oxidative stress in mdx mouse muscle: studies of the pre-necrotic state. **J Neurol Sci.** v.161, p.77-84, 1998.

DOWLING, P., LOHAN, J., OHLENDIECK, K. Comparative analysis of Dp427-deficient mdx tissues shows that the milder dystrophic phenotype of extraocular and toe muscle fibres is associated with a persistent expression of beta-dystroglycan. **Eur J Cell Biol.** v.82, p.222-230, 2003.

DOWLING, P., DORAN, P., OHLENDIECK, K. Drastic reduction of sarcalumenin in Dp427-deficient fibres indicates that abnormal calcium handling plays a key role in muscular dystrophy. **Biochem J.** v.379, p.479-488, 2004.

ENGEL, A.G., YAMAMOTO, M., FISCHBECK, K.H. Dystrophinopathies. In: Engel, AG, Franzini-Armstrong, C, editors **Myology**. New York: McGraw-Hill; v.2, p.1133-1187, 1994. ISBN 0070195595.

ERVASTI, J.M., OHLENDIECK, K., KAHL, S.D., GAVER, M.G., CAMPBELL, K. Deficiency of a glycoprotein component of the dystrophin complex in dystrophic muscle. **Nature.** v.345, p.315-319, 1990.

ERVASTI, J.M., CAMPBELL, K.P. A role for the dystrophin-glycoprotein complex as a transmembrane linker between laminin and actin. **J Cell Biol.** v.122, p.809-823, 1993.

FONG, P.Y., TURNER, P.R., DENETCLAW, W.F., STTEINHARDT, R.A. Increased activity of calcium leak channels in myotubes of Duchenne human and *mdx* mouse origin. **Science**. v.250, p.673-676, 1990.

FRANCO-OBREGON JR, A., LANSMAN, J.B. Calcium entry through stretch-inactivated ion channels in *mdx* myotubes. **Nature**. v.344, p.670-673, 1990.

FRANCO-OBREGON JR, A., LANSMAN, JB. Mechanosensitive ion channels in skeletal muscle from normal and dystrophic mice. **J Physiol**. v.481, p.299-309, 1994.

GAILLY, P. New aspects of calcium signaling in skeletal muscle cells: implications in Duchenne muscular dystrophy. **Biochim Biophys Acta**. v.1600, p.38-44, 2002.

GILMAN, A.G., RALL, T.W., NIES, A.S., TAYLOR, P. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 8.ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan. p.1232, 1991.

GISSEL, H. The role of Ca²⁺ in muscle cell damage. *Ann N Y Acad Sci*. v.1066, p.166-180, 2005.

GLESBY, M.J., ROSENMENN, E., NYLEN, E.G., WROGEMANN, K. Serum CK calcium, magnesium, and oxidative phosphorylation in *mdx* mouse muscular dystrophy. **Muscle Nerve**. v.11, p.852-856, 1988.

GROUND, M.D., SOROKIN, L., WHITE, J. Strength at the extracellular matrix-muscle interface. **Scand J Med Sci Sports**. v.15, p.381-391, 2005a.

GROUND, M.D., DAVIES, M., TORRISI, J., SHAVLAKADZE, T., WHITE, J., HODGETTS, S. Silencing TNF α activity by using Remicade or Enbrel blocks inflammation in whole muscle grafts: an in vivo bioassay to assess the efficacy of anti-cytokine drugs in mice. **Cell Tissue Res**. v.320(3), p.509-515, 2005b.

GROUND, M.D., TORRISI, J. Anti-TNF α (Remicade®) therapy protects dystrophic skeletal muscle from necrosis. **FASEB J**. v.18, p.676-682, 2004.

HAMER, P.W., MCGEACHIE, J.M., DAVIES, M.J., GROUND, M.D. Evans blue dye an in vivo marker of myofibre damage: optimising parameters for detecting initial myofibre membrane permeability. **J Anat**. v.200, p.69-79, 2002.

HAN, R., GROUNDS, M.D., BAKKER, A.J. Measurement of sub-membrane $[Ca^{2+}]$ in adult myofibers and cytosolic $[Ca^{2+}]$ in myotubes from normal and mdx mice using the Ca^{2+} indicator FFP-18. **Cell Calcium**. v.40, p.299-307, 2006.

HOPF, F.W., REDDY, P., HONG, J., STEINHARDT, R.A. A capacitative calcium current in cultured skeletal muscle cells is mediated by the calcium-specific leak channel and inhibited by dihydropyridine compounds. **J Biol Chem**. v.271, p.358-367, 1996.

HOLTERMAN, C.E., RUDNICK, M.A. Molecular regulation of satellite cell function. **J Biophys Biochem Cytol** v.9, p.575-584, 2005.

IBRAGHIMOV-BESKROVNAYA, O., ERVASTI, J.M., LEVEILLE, C.J., SLAUGHTER, C.A., SERNETT, S.W., CAMPBELL, K.P. Primary structure of dystrophin-associated glycoproteins linking dystrophin to the extracellular matrix. **Nature**. v.355, p.696-702, 1992.

ISLAM, M.N., NARAYANAN, B., OCHS, R.S. A mechanism for both capacitative Ca^{2+} entry and excitation-contraction couple Ca^{2+} release by the sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle cells. **Exp Biol Med**. v.227(6), p.425-431, 2002.

IWATA, Y., KATANOSAKA, Y., SHIJUN, Z., KOBAYASHI, Y., HANADA, H., SHIGEKAWA, M., WAKABAYASHI, S. Protective effects of Ca^{2+} handling drugs against abnormal Ca^{2+} homeostasis and cell damage in myopathic skeletal muscle cells. **Biochem Pharmacol**. v.70, p.740-751, 2005.

JACKSON, M.J., JONES, D.A., EDWARDS, R.H. Measurements of calcium and other elements in muscle biopsy samples from patients with Duchenne muscular dystrophy. **Clin Chim Acta**. v.147, p.215-221, 1985.

JANIS, R.A., SILVER, P.J., TRIGGLE, D.J. Drug Action and cellular calcium regulation. **Adv Drug Res**. v.16, p.309-591, 1987.

JONHSON, P.L., BHATTACHARYA, S.K. Regulation of Membrane-Mediated Chronic Muscle Degeneration in Dystrophic Hamsters by Calcium-Channel Blockers – Diltiazem, Nifedipine and Verapamil. **J Neurol Sci**. v.115(1), p.76-90, 1993.

KATIRJI, B., AL-JABERI, M.M. Creatine Kinase Revisited. **J Clin Neuromuscul Dis**. v.2, p.158-163, 2001.

LAEMMLI, U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**. v.277, p.680-685, 1970.

LAPIDOS, K., KAKKAR, R., MCNALLY, E. The dystrophin-glycoprotein complex signaling strength and integrity for the sarcolemma. **Circ Res**. v.94, p.1023-1031, 2004.

LEFAUCHEUR, J.P., PASTORET, C., SEBILLE, A. Phenotype of dystrophinopathy in old mdx mice. **Anat Rec**. v.242, p.70-76, 1995.

LEFKOWITZ, D.L., LEFKOWITZ, S.S. Fascioscapulohumeral muscular dystrophy: A progressive degenerative disease that responds to diltiazem. **Med hypotheses**. v.65, p.716-721, 2005.

LUZ, M., MARQUES, M., NETO, H. Impaired regeneration of dystrophin-deficient muscle fibers is caused by exhaustion of myogenic cells. **Braz J Med Biol Res**. v.35(6), p.691-695, 2002.

MALLOUK, N., JACQUEMOND, V., ALLARD, B. Elevated subsarcolemmal Ca^{2+} in *mdx* mouse skeletal muscle fibers detected with Ca^{2+} -activated K^{+} channels. **Proc Natl Acad Sci USA**. v.97, p.4950-4955, 2000.

MARQUES, M.J. Structural biology of the dystrophin-deficient muscle fiber. **Braz J Morphol Sci**. v.21(3), p.145-152, 2004.

MARQUES, M. J., FERRETI, R., VOMERO, V. U., MINATEL, E., SANTO NETO, H. Intrinsic laryngeal muscles are spared from myonecrosis in the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy. **Muscle Nerve**, v.35, p.349-353, 2007a.

MARQUES, M. J., PERTILLE, A., CARVALHO, V. C., CARVALHO, C. L. T., SANTO NETO, H. Acetylcholine receptor organization at the dystrophic extraocular muscle neuromuscular junction. **Anat Rec. Part A**. v.290, p.846-854, 2007b.

MARQUES, M.J., MATSUMURA, C.Y., SANTO NETO, H. Alterations in the permeability of dystrophic fibers during neuromuscular junction development. **Acta Biol Hung**. v.58, p.1-9, 2007c.

MARQUES, M.J., MACHADO, R.V., MINATEL, E., SANTO NETO, H. Disodium cromoglycate protects dystrophin-deficient muscle fibers from leakiness: studies in *mdx* sternomastoid, diafragm and tibialis anterior. **Muscle Nerve**. 2008.

MATECKI, S., GUIBINGA, G.H., PETROF, B.J. Regenerative capacity of the dystrophic (*mdx*) diaphragm after induced injury. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**. v.287, p.R961–R968, 2004.

MATSUDA, R.A., NISHIKAWA, A., TANAKA, H. Vizualization of dystrophic muscle fibers in *mdx* mouse by vital staining with Evans blue: evidence of apoptosis in dystrophin-deficient muscle. **J Biochem**. v.118, p.959-964, 1995.

McDOUALL, R.M., DUNN, M.J., DUBOWITZ, V. Nature of the mononuclear infiltrate and the mechanism of muscle damage in juvenile dermatomyositis and Duchenne muscular dystrophy. **Journal of Neurological Science**. v.99, p.199-217, 1990.

MCNEIL, P.L., STEINHARDT, R.A. Loss, restoration, and maintenance of plasma membrane integrity. **J Cell Biol**. v.137(1), p. 1-4. 1997.

MOKRI, B., ENGEL, A.G., Duchenne dystrophy: electron microscopic findings pointing to a basic or early abnormality in the plasma membrane of the muscle fiber. **Neurology**. v.25, p.1111-1120, 1975.

PASTERNAK, C., WONG, S., ELSON, E.L. Mechanical function of distrophin in muscle cells. **J Cell Biol**. v.128(3), p.355-361, 1995.

PASTORET, C., SEBILLE, A. *Mdx* mice show progressive weakness and muscle deterioration with age. **J Neurol Sci**. v.129, p.97-105, 1995.

PAYDAR, M.J., POUSTI, A., FARSAM, H., AMANLOU, M., MEHR, S.E., DEHPOUR, A.R. Effects of diltiazem or verapamil on calcium uptake and release from chicken skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. **Can J Physiol Pharmacol**. v.83(11), p.967-975, 2005.

PERNICE, W., BECKMANN, R., KETELSEN, U.P., FREY, M., SCHMIDT-REDEMANN, B., HAAP, K.P., ROEHREN, R., SAUER, M. A double-blind placebo controlled trial of diltiazem in Duchenne dystrophy. **Klin Wochenschr**. v.66, p.565-570, 1988.

PERTILLE, A., CARVALHO, C.L.T., SANTO NETO, H., MARQUES, M.J. Increased expression of calcium-binding proteins in extraocular muscles of dystrophin-deficient mdx mice: potential role in muscle sparing. **Neuromuscul Disord.**, *submetido*.

PETROF, B.J., SHRAGER, J.B., STEDMAN, H.H., KELLY, A.M., SWEENEY, H.L. Dystrophin protects the sarcolemma from stresses developed during muscle contraction. **Proc Natl Acad Sci USA**. v.90, p.3710-3714, 1993.

PETROF, B.J. The molecular basis of activity-induced muscle injury in Duchenne muscular dystrophy. **Mol Cell Biochem**. v.179, n.1-2, p.111-123, 1998.

PETROF, B.J. Molecular pathophysiology of myofiber injury in deficiencies of the dystrophin-glycoprotein complex. **Am J Phys Med Rehabil**. v.81 (Supl), p.S162–S174, 2002.

PORTER, J.D., KHANNA, S., KAMINSKI H.J., RAO, J.S., MERRIAN, A.P., RICHMONDS, C.R., LEAHY, P., LI, J., GUO, W., ANDRADE, F.H. A chronic inflammatory response dominates the skeletal muscle molecular signature in dystrophin-deficient mdx mice. **Hum Mol Genet**. v.11(3), p.263-272, 2002.

POZZAN, T., RIZZUTO, R., VOLPE, P., MELDOLESI, J. Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores. **Physiol Rev**. v.74(3), p.595-636, 1994.

RADLEY, H., GROUNDS, M.D. Cromolyn administration(to block mast cell degranulation) reduces necrosis of dystrophic muscle in *mdx* mice. **Neurobiol Dis**. v.23, p.387-397, 2006.

RANDO, T.A. The dystrophin-glycoprotein complex, cellular signaling and the regulation of cell survival in the muscular dystrophies. **Muscle Nerve**. v.24, p.1575-1594, 2001.

REEVE, L.L., MCARDLE, A., JACKSON, M.J., Age-related changes in muscle calcium content in dystrophin-deficient mdx mice. **Muscle Nerve**. v.20, p.357-360, 1997.

ROBERT, V., MASSIMINO, M L., TOSSELO, V., MARSAULT, R., CANTINI, M., SORRENTINO, V. Alterations in calcium handling at the subsarcolemal level in *mdx* myotubes. **J Biol Chem**. v.276, p.4647-4651, 2001.

ROSENBERG, R.L., HESSE, P., REEVES, J.P., SMILOWITZ, H., TSIEN, R.W. Calcium channels in planar lipid bilayers: Insights into mechanism of ion permeation and gating. **Science**. v.231, p.1564-1567, 1986.

ROSSI, A.E., DIRKSEN, R.T. Sarcoplasmic reticulum: the dynamic calcium governor of muscle. **Muscle Nerve**. v.33, p.715-731, 2006.

RUEGG, U.T., NICOLAS-MÉTRAL, V., CHALLET, C., BERNARD-HÉLAY, K., DORCHIES, O.M., WAGNER, S., BUETLER, T.M. Pharmacological control of cellular calcium handling in dystrophic skeletal muscle. **Neuromuscul Disord**. v.12, p.S155-S161, 2002.

SASAKA, T., IMAMURA, M., ARAISHI, K., NOGUCHI, S., MIZUNO, Y., TAKAGOSHI, N., HAMA, H., WAKABAYASHI-TAKAI, E., YOSHIMOTO-MATSUDA, Y., NONAKA, I., KANEKO, K., YOSHIDA, M., OZAWA, E. Pathological analysis of muscle hypertrophy and degeneration in muscular dystrophy in γ -sarcoglycan-deficient mice. **Neuromuscul Disord**. v.13, p.193-206, 2003.

SCHMALBRUCH, H. Regenerated muscle fibers in Duchenne muscular dystrophy: A serial section study. **Neurology**. v.34, p.60-65, 1984.

SEIXAS, S.L., CÂNDIDO, J.L., SARINO, W., QUIRICO-SANTOS, T. Importância do camundongo *mdx* na fisiologia da distrofia muscular de Duchenne. **Arq Neuropsiquiatr**. v.55 (3-B), p.610-617, 1997.

SPENCER, M.J., MELLGREN, R.L. Overexpression of a calpastatin transgene in *mdx* muscle reduces dystrophic pathology. **Hum Mol Genet**. v.11(21), p.2645-2655, 2002.

STEDMAN, H.H., SWEENEY, H.L., SHRAGER, J.B., MAGUIRE, H.C., PANETTIERI, R.A., PETROF, B., NARUSAWA, M., LEFEROVICH, J.M., SLADKY, J.T., AND KELLY, A.M. The *mdx* mouse diaphragm reproduces the degenerative changes of Duchenne muscular dystrophy. **Nature**. v.352, p.536-539, 1991.

STRAUB, V., RAFAEL, J.A., CHAMBERLAIN, J.S., CAMPBELL, K.P. Animal models for muscular dystrophy show different patterns of sarcolemma disruption. **J Cell Biol**. v.139(2), p.375-385, 1997.

TANABE, Y., ESAKI, K., NOMURA, T. Skeletal muscle pathology in X chromosome-linked muscular dystrophy (*mdx*) mouse. **Acta Neuropathol**. v.69(1-2), p.91-95, 1986.

- TINSLEY, J.M., BLAKE, D.J., RICHARD, A.Z., DAVIS, K.E. Increase complexity of the dystrophin-associated protein complex. **Proc Natl Acad Sci USA**. v.91, p.8307-8313, 1994.
- TURNER, P.R., WESTWOOD, T., REGAN, C.M., STEINHARDT, R.A. Increase protein degradation results from elevated free calcium levels found in muscle from *mdx* mice. **Nature**. v.335, p.735-738, 1988.
- TURNER, P.R., FONG, P., DENETCLAW, W., STEINHARDT, R.A. Increase calcium influx in dystrophic muscle. **J Cell Biol**. v.115(6), p.1701-1712, 1991.
- TURNER, P.R., SCHULTZ, R., GANGULY, B., STEINHARDT, R.A. Proteolysis results in altered leak channel kinetics and elevated free calcium in *mdx* muscle. **J Membr Biol**. v.133, p.243-251, 1993.
- VANDEBROUCK, A., MARTIN, D., COLSON-VAN SCHOOR, M., DEBAIX, H., GAILLY, P. Involvement of TRPC in the abnormal calcium influx observed in dystrophic (*mdx*) mouse skeletal muscle fibers. **J Cell Biol**. v.158, p.1089-1096, 2002.
- VANDEBROUCK, A., DUCRET, T., BASSET, O., SEBILLE, S., RAYMOND, G., RUEGG, U., GAILLY, P., COGNARD, C., CONSTANTIN, B. Regulation of store-operated calcium entries and mitochondrial uptake by minidystrophin expression in culture myotubes. **FASEB J**. v.20(1), p.136-138, 2006.
- VANDEBROUCK, A., SABOURIN, J., RIVET, J., BALGHI, H., SEBILLE, S., KITZIS, A., RAYMOND, G., COGNARD, C., BOURMEYSTER, N., CONSTANTIN, B. Regulation of capacitative calcium entries by $\alpha 1$ -syntrophin: association of TRPC1 with dystrophin complex and the PDZ domain of $\alpha 1$ -syntrophin. **FASEB J**. v.21, p.608-617, 2007.
- WANG, T., TSAI, L.I., SCHWARTZ, A. Effects of Verapamil, Diltiazem, Nisoldipine and Felodipine on Sarcoplasmic-Reticulum. **Eur J Pharmacol**. v.100(3-4), p.253-261, 1984.
- WEHLING-HENRICKS, M.; JORDAN, M.C.; ROOS, K.P.; DENG, B.; TIDBALL, J.G. Cardiomyopathy in dystrophin-deficient hearts is prevented by expression of a neuronal nitric oxide synthase transgene in the myocardium. **Hum Mol Genet**. v.14, p.1921-1933, 2005.
- WHITEHEAD, N.P., YEUNG, E.W., ALLEN, D.G. Muscle damage in *mdx* (dystrophic) mice: role of calcium and reactive oxygen species. **Clin Exp Pharmacol Physiol**. v.33, p.657-662, 2006.

YANO, K., ZARAIN-HERZBERG, A. Sarcoplasmic reticulum calsequestrins: structural and functional properties. **Mol Cell Biochem.** v.135(1), p.61-70, 1994.

YOSHIDA, M., YONETANI, A., SHIRASAKI, T., WADA, K. Dietary NaCl supplementation prevents muscle necrosis in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.** v.290(2), p.R449-R455, 2006.

8. ARTIGO SUBMETIDO (*Muscle and Nerve*)

Diltiazem and verapamil protect dystrophin-deficient muscle fibers of *mdx* mice from degeneration: a potential role in calcium buffering and sarcolemmal stability

Cintia Yuri Matsumura, Humberto Santo Neto, PhD, and Maria Julia Marques, PhD

Departamento de Anatomia, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, 13083-970, Brazil.

Acknowledgments: This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, grants 95/6110-2, 01/00570-4 and 04/15526-9). H.S.N. and M.J.M. are recipients of fellowships from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, grants 301286/03-5 and 302880/04-6). C.Y.M. was the recipient of a FAPESP fellowship (grant 06/54114-3).

All correspondence should be addressed to:

Dr. Maria Julia Marques

Departamento de Anatomia, Instituto de Biologia,
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

Campinas, SP, 13083-970, Brazil.

Email: marques@unicamp.br

Phone: +55-19-3521-6395

Running title: Calcium channel blockers protect against dystrophy.

Abstract

The lack of dystrophin in dystrophin-deficient fibers of *mdx* mice and in Duchenne muscular dystrophy causes sarcolemmal breakdown and increased calcium influx followed by muscle degeneration. We examined whether the calcium channel blockers diltiazem and verapamil may protect dystrophic muscles from degeneration. *Mdx* mice (n=32; 18 days old) received daily intraperitoneal injections of diltiazem (n=16; 72 mg/kg body weight) or verapamil (n=16; 25 mg/kg body weight) for 18 days, followed by removal of the sternomastoid, diaphragm, tibialis anterior and cardiac muscles. Control *mdx* mice (n=16) were injected with saline. Both drugs significantly decreased blood creatine kinase. Total calcium content measured by plasma emission spectrometry was 173-475% higher in *mdx* muscles than in control C57Bl/10 muscles. Verapamil and diltiazem reduced total calcium content only in diaphragm and cardiac muscle. Histological analysis showed that diltiazem significantly attenuated muscle degeneration only in diaphragm muscle. Immunoblots showed a significant increase of calsequestrin and β -dystroglycan levels in some diltiazem- and verapamil-treated muscles. Diltiazem was more effective than verapamil in protecting *mdx* mice against muscle degeneration, especially in the more affected muscles. These results indicate that calcium channel blockers protect against muscle degeneration in the absence of dystrophin and suggest that these drugs might be useful therapeutic alternatives in the treatment of Duchenne muscular dystrophy.

Key words: Beta-dystroglycan, calcium, calsequestrin, diltiazem, Evans blue dye, *mdx*, muscle degeneration, verapamil.

Introduction

In *mdx* mice and in Duchenne muscular dystrophy (DMD), defects associated with muscular dystrophy generally include a lack of the protein dystrophin.^{1,2} In addition, other components of the dystrophin-glycoprotein complex (DGC) are also dramatically reduced or absent in the sarcolemma of dystrophic fibers compared to normal muscles.³ The DGC is a multi-subunit complex that spans the sarcolemma, forming a link between the extracellular matrix and the actin cytoskeleton.⁴ Disruption of the DGC affects membrane integrity.

The lack of dystrophin, or of a normal DGC, is associated with changes in membrane stability and increased levels of calcium in the muscle fiber causing myonecrosis.^{5,6} While cell and gene therapies to replace the defective dystrophin gene are under development,⁷ the identification of pharmacological therapies that can slow down the process of muscle degeneration is of great importance.⁸⁻¹¹

Several studies have reported a chronic increase in cytosolic Ca^{2+} concentration beneath the sarcolemma or within other cell compartments of skeletal muscle fibers or in cultured myotubes from DMD patients and *mdx* mice.¹²⁻¹⁵ The mechanisms responsible for the increase of calcium in dystrophic fibers are still not completely understood, but store-operated and stretch-activated calcium channels seem to be primarily involved.¹⁶ Components of the DGC may be implicated in the stabilization of these channels so that, in the absence of dystrophin, alterations in these channels seem to occur.^{17,18} In addition, in *mdx* mice abnormal calcium handling by calcium-buffering proteins has been suggested to play a major role in the secondary steps leading to muscle fiber necrosis.^{19,20} Calcium channel blockers such as verapamil and diltiazem are widely used for the treatment of hypertension due to their ability to control the influx of calcium into cardiac cells.^{21,22} Diltiazem and verapamil act through L-type voltage-dependent calcium

channels²² and the potential usefulness of these drugs for the treatment of muscular dystrophy has been investigated in dystrophic hamsters^{23,24} and humans.²⁵ In DMD, diltiazem has shown no beneficial effect, but technical difficulties inherent to clinical trials such as the small number of subjects, the reduced number and size of biopsy specimens and differences in the individual courses of muscle degeneration have been reported.²⁵

Iwata et al. (2005) have previously reported the effects of verapamil and diltiazem on creatine kinase (CK) levels in *mdx* mice. The present study adds information regarding the effects of verapamil and diltiazem on the extent of muscle fiber damage in dystrophin-deficient fibers of *mdx* mice. We studied axial (sternomastoid and diaphragm), limb (tibialis anterior, TA) and cardiac muscles and observed that diltiazem was more effective than verapamil in protecting against muscle degeneration, especially in the more affected muscles. Furthermore, we were also interested to see whether changes in calcium levels would affect signaling mechanisms related to calcium-buffering proteins and the expression of DGC components that are involved in muscle fiber protection. We therefore examined the effects of calcium blockers on the levels of calsequestrin and β -dystroglycan.

Material and Methods

Animals

Male and female *mdx* mice obtained from a breeding colony maintained by our institutional animal care facility were used in all experiments. The mice were housed according to institutional guidelines and had access to food and water *ad libitum*. Pregnant females were separated and monitored daily. The date of birth was designated as postnatal day 0. Diltiazem and verapamil treatment was initiated on postnatal day 18 before the onset of the muscle

degeneration-regeneration cycles.^{27,28} The animals were weaned at 21 days of age. The animal experiments described here were done in accordance with the guidelines of the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA; process #1124-1) and the guidelines set forth by our Institution.

Drug administration

Mdx mice (n=32; 18 days old) received daily intraperitoneal injections of diltiazem (n=16; 72 mg/kg body weight) or verapamil (n=16; 25 mg/kg body weight)²⁴ for 18 days. Each animal was weighed daily so that the drug dose could be accurately adjusted. Control *mdx* mice (n=16) were injected with saline.

Analysis of creatine kinase

For biochemical evaluation of muscle fiber degeneration, control C57Bl/10 mice (n=3) and diltiazem- (n=5), verapamil- (n=5) and saline-treated (n=5) *mdx* mice were anesthetized with a mixture of ketamine hydrochloride (130 mg/kg, Francotar, Virbac) and xylazine hydrochloride (6.8 mg/kg, 2% Virbaxil, Virbac), and blood samples (0.8 ml) were collected by cardiac puncture. After incubation at room temperature for 1-2 h to allow for clotting, the samples were microcentrifuged at 3000 rpm for 10 min, and the supernatant (plasma) was removed and used for analysis. The CK assay was performed using a commercially available kit (CK Cinético Crystal, Bioclin) and a Thermo Electron Corporation Genesys 20 spectrophotometer. Values are reported as international units.

Measurement of total calcium in muscle

Muscles (sternomastoid, TA, diaphragm and cardiac) were excised under deep anesthesia with a mixture of ketamine hydrochloride (130 mg/kg, Francotar, Virbac) and xylazine hydrochloride (6.8 mg/kg, 2% Virbaxil, Virbac). The muscles were weighed and digested with 0.2 ml ultrapure HNO₃ at 100°C. The samples were diluted to a final volume of 10 ml with ultrapure water. Calcium content was determined by inductively coupled plasma-optical emission spectrometry (ICP-OES; Optimum 3000 Duo View, Perkin-Elmer).

Evans blue dye analysis

For morphological visualization and quantification of muscle fiber damage, drug-treated (n=10) and saline-treated (n=5) *mdx* mice were injected with Evans blue dye (EBD; Sigma), a marker of sarcolemmal damage.²⁹ The animals received an intraperitoneal injection of 1% EBD in PBS (0.15 M NaCl, 10 mM phosphate buffer, pH 7.4) at a dose of 100 µl per 10 g body weight. The mice were visually examined for dye uptake. Discoloration of all animals was observed within 1-2 h after intraperitoneal injection of EBD, and successful injection of the dye was indicated by a blue color of the ears and paws.

Twelve hours later, the mice were anesthetized with a mixture of ketamine hydrochloride (130 mg/kg, Francotar, Virbac) and xylazine hydrochloride (6.8 mg/kg, 2% Virbaxil, Virbac), and the sternomastoid, TA and diaphragm muscles were dissected out, snap frozen in isopentane, cooled in liquid nitrogen and stored at -70°C. These muscles were chosen because they represent axial (sternomastoid), respiratory (diaphragms) and appendicular (TA) muscles that are differently affected in DMD, with respiratory muscles being more severely impaired than limb and axial muscles.³⁰

Cryostat cross-sections (7 μm thick) were incubated in ice-cold acetone at -20°C for 10 min, washed 3 times for 10 min in PBS, and mounted in DABCO (mounting media for fluorescence; Sigma). EBD emits a bright red color when analyzed under a fluorescence microscope. The number of EBD-positive muscle fibers was determined in all sections with a hand counter and the fibers were photographed under a Nikon fluorescence microscope connected to a Hamamatsu video camera. The number of EBD-positive muscle fibers is expressed as the percentage of the total number of muscle fibers counted in each section.

Histopathological analysis

Cryostat cross-sections of the diaphragm, sternomastoid and TA muscles were stained with hematoxylin-eosin. Slides were examined under a Nikon Eclipse E 400 microscope connected to a personal computer and a video camera (Nikon Express Series). Non-overlapping images of the entire muscle cross-section were taken and tiled together using the ImagePro-Express[®] software (Media Cybernetics). The total area of each cross-section, the number of central nucleated fibers and the number of fibers with peripheral nuclei were counted with a hand counter and are expressed as the percentage of the total number of fibers counted in each cross-section.

western blot analysis

The calcium-binding protein, calsequestrin, and the DGC-associated protein, β -dystroglycan, were quantified by western blotting in control C57Bl/10 mice ($n=6$) and in diltiazem- ($n=6$), verapamil- ($n=6$) and saline-treated ($n=6$) *mdx* mice.

Muscles were lysed in assay lysis buffer containing freshly added protease and phosphatase inhibitors (1% Triton, 10 mM sodium pyrophosphate, 100 mM NaF, 10 µg/ml aprotinin, 1 mM PMSF, and 0.25 mM Na₃VO₄). The samples were centrifuged for 20 min at 11,000 rpm and the soluble fraction was resuspended in 50 µl Laemmli (1970) loading buffer (2% SDS, 20% glycerol, 0.04 mg/ml bromophenol blue, 0.12 M Tris-HCl, pH 6.8, and 0.28 M β-mercaptoethanol) before separation on 8%-15% SDS-polyacrylamide gels. Proteins were transferred from the gels to a nitrocellulose membrane using a submersion electrotransfer apparatus (Bio-Rad Laboratories). Membranes were blocked for 2 h at room temperature with 5% skim milk/Tris-HCl buffer saline-Tween buffer (TBST; 10 mM Tris-HCl, pH 8, 150 mM NaCl, and 0.05% Tween 20). The membranes were incubated with the primary antibodies overnight at 4°C, washed in TBST, incubated with the peroxidase-conjugated secondary antibodies for 2 h at room temperature, and developed using the SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate kit (Pierce Biotechnology).

The following primary antibodies were used for western blotting: 1) β-dystroglycan (monoclonal NCL-b-DG, Novocastra), 2) calsequestrin (monoclonal VIIID12, Affinity BioReagents). Anti-mouse IgG-FITC (Sigma) was used as the corresponding secondary antibody for immunofluorescence. The corresponding secondary antibody used for western blotting was peroxidase-labeled affinity-purified mouse IgG antibody (H+L) (KPL).

Statistical analysis

Data are expressed as means ± SEM or SD and were analyzed by the Student *t*-test.

Results

No significant differences in weight gain were observed between calcium channel blocker-treated and non-treated (saline injected) *mdx* mice during the study period. The mean body weight was 15.5 ± 1.8 g for diltiazem-treated *mdx* mice, 15.6 ± 2.5 g for verapamil-treated mice and 16.4 ± 1.8 g for saline-treated mice ($p > 0.05$; Student *t*-test). These results show that calcium channel blocker treatment did not interfere with the growth rate of young *mdx* mice.

CK levels were significantly higher in *mdx* mice than in control C57Bl/10 mice (Table 1). Both drugs significantly decreased CK levels in *mdx* mice when compared to saline-injected muscles, with diltiazem apparently being more effective than verapamil (72% vs. 62%) (Table 1).

The total amount of calcium in each muscle studied was significantly higher in *mdx* mice compared to control (Fig. 1). Diltiazem significantly decreased total calcium content in heart muscle ($p = 0.04$) and in the diaphragm muscle, although in the latter the decrease was not statistically significant ($p = 0.06$). Verapamil decreased total calcium content only in heart muscle (Fig. 1). Diltiazem and verapamil caused an increase of total calcium content in TA muscle.

The histological appearance of muscles from calcium channel blocker- and saline-treated *mdx* mice is shown in Fig. 2. Inflammatory cells, myoblasts and myotubes predominated in the inflammation/regeneration area (Fig. 2C, D). Myotubes and myofibers were mainly seen in the regeneration area (Fig. 2E, F). Completely regenerated muscle fibers were characterized by central nucleation and an apparent normal diameter (Fig. 2B). In addition, round or roughly polygonal muscle fibers, whose nuclei presented a random peripheral location directly below the sarcolemma, were observed (Fig. 2B).

EBD-positive fibers were seen in groups or isolated (Fig. 2A). In saline-treated *mdx* mice, the largest number of EBD-positive fibers was observed in the diaphragm muscle compared to sternomastoid and TA muscles (Table 2). Diltiazem caused a significant decrease in EBD

staining and increased the percentage of fibers with peripheral nuclei only in the diaphragm muscle (Table 2). Verapamil decreased the percentage of EBD-positive fibers in the diaphragm, but this difference was not statistically significant.

Immunoblotting revealed that β -dystroglycan was significantly reduced in *mdx* mice in all muscles studied (Fig. 3). Diltiazem and verapamil increased the levels of β -dystroglycan in sternomastoid and TA muscles, whereas no changes were observed in the diaphragm muscle (Fig. 3). Calsequestrin levels were unchanged in *mdx* mice compared to controls (Fig. 4). Verapamil resulted in a significant increase of calsequestrin in all muscles studied (sternomastoid, diaphragm and TA), whereas a similar effect of diltiazem was only observed in TA muscle (Fig. 4).

Discussion

Membrane-mediated excessive influx of calcium is a fundamental pathogenic event associated with muscle degeneration in patients with DMD and in animal models of DMD such as the *mdx* mouse.¹² In view of their potential calcium channel-blocking properties, we investigated the efficacy of diltiazem and verapamil in reducing muscle degeneration in *mdx* mice.

Several studies have investigated the use of diltiazem for the treatment of DMD. Although these studies indicated some positive effects of diltiazem, there were no statistically significant data supporting its treatment efficacy.^{25,26,31} In a hamster model of dystrophy, diltiazem was found to be effective in protecting against muscle degeneration.^{23,24} In the present study, we observed that diltiazem and verapamil significantly decreased serum CK levels in *mdx* mice. In dystrophic fibers, the increased influx of calcium that leads to muscle degeneration seems to occur mainly through mechanosensitive voltage-independent calcium channels.¹⁷ The

present results suggest that L-type Ca^{2+} channels may also contribute to dystrophic muscle degeneration. Histopathological analysis revealed that a decrease in sarcolemma permeability, demonstrated by EBD-positive fibers, only occurred in the diaphragm muscle of diltiazem-treated *mdx* mice. At the age studied, the diaphragm was the most affected muscle compared to TA, sternomastoid and cardiac muscles, showing the largest number of EBD-positive fibers. This result supports the fact that elevated $[\text{Ca}^{2+}]_i$ is a key factor responsible for muscle dysgenesis and that calcium channel blocker therapy would be most effective once myonecrosis is under way, protecting the main affected muscles such as the diaphragm, followed by the cardiac muscle.

Total calcium content in each muscle studied was significantly elevated in *mdx* mice compared to control C57Bl/10 mice. In *mdx* mice or DMD patients, the sarcolemma is mechanically weakened, a fact apparently favoring the influx of calcium.^{32,33,34} In addition, basal activities of Ca^{2+} -selective leak channels have been reported to be significantly elevated in dystrophin-deficient myotubes or dystrophic skeletal muscle fibers,³⁵ and this may explain the increased calcium concentration in *mdx* fibers seen in the present study. The plasma emission spectrometry technique used here seems to be a valuable tool for the evaluation of overall changes in calcium as a result of drug therapy or other experimental conditions,³⁶ and the results may be best compared to those obtained for DMD patients, in whom muscle biopsies are taken for the determination of muscle calcium content.^{25,26} In DMD, muscle Ca^{2+} was not found to be affected by diltiazem.²⁶ In the present study, the two drugs were able to decrease total calcium content only in cardiac muscle, probably because of a cardiovascular targeted effect of these drugs.^{21,22} In the diaphragm, there was a trend toward a reduction in total calcium but this was not statistically significant. In the sternomastoid and TA muscles, both drugs led to a significant increase in total calcium content but we do not know the reason for this different effect. One explanation might be differences in extracellular calcium concentration since we only studied

total calcium content. Other actions of diltiazem and verapamil on skeletal muscles *per se*, such as the inhibition of calcium leak channels³⁷ or the ability to regulate calcium storage inside the various cellular compartments,³⁸ may also explain this result. The increased total calcium observed in sternomastoid and TA muscles was not correlated with increased degeneration of these muscles, suggesting that these muscles were able to handle the increases in intracellular/extracellular calcium.

Verapamil increased the levels of the sarcoplasmic reticulum calcium-binding protein calsequestrin in the diaphragm, sternomastoid and TA muscles. A similar effect of diltiazem was only observed in TA muscle. Calsequestrin has been suggested to be a luminal Ca^{2+} sensor, responding to small changes in luminal Ca^{2+} concentration.³⁹ Diltiazem and verapamil seem to affect the rates of Ca^{2+} transport in both cardiac and skeletal sarcoplasmic reticulum and the activity of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase.⁴⁰ These blockers also inhibit voltage-independent calcium leak channels, which are activated upon calcium depletion in the sarcoplasmic reticulum, similar to the store-operated channel.⁴¹ Thus, the changes in calsequestrin levels observed in the present investigation might have been secondary to the action of these drugs on calcium influx and calcium concentration in the sarcoplasmic reticulum. The fact that calsequestrin was unchanged in *mdx* mice also suggests that the alterations in calcium that occur in *mdx* fibers may be related to other sarcoplasmic reticulum calcium-binding proteins such as SERCA1, regucalcin and ryanodine receptor.⁴² Thus, it would be interesting to see whether diltiazem and verapamil affect these proteins in *mdx* fibers.

The central trans-sarcolemmal linker of the DGC, β -dystroglycan,^{43,44} was significantly reduced in *mdx* muscle, a finding that agrees with the fact that the lack of dystrophin leads to changes in the expression of all proteins of the DGC.⁴⁵ A striking finding was that verapamil and diltiazem led to a marked increase of β -dystroglycan in all muscles, except in the diaphragm

(verapamil and diltiazem) and cardiac muscle (diltiazem), thus demonstrating that drugs therapeutically used to decrease $[Ca^{2+}]_i$ are associated with the upregulation of β -dystroglycan, at least in some muscles. Other drugs such as agrin⁴⁶ and glucocorticoids⁴⁷ have been shown to affect the levels of DGC molecules. L-arginine significantly increased utrophin levels in dystrophic *mdx* muscle and β -dystroglycan was relocalized with utrophin to the membrane, with consequent improvement in muscle morphology and decreased serum CK levels in *mdx* mice.⁴⁸ Whether the increased level of β -dystroglycan observed here is associated with increased levels of utrophin remains to be established. Depending on their concentration, verapamil and diltiazem have been shown to exert membrane actions other than their calcium channel-blocking activity.⁴⁰ This fact may explain the effect of these drugs on β -dystroglycan and, possibly, on other components of the DGC. Furthermore, differences in the lipid composition of the sarcolemma between skeletal and cardiac muscles may explain the different effects among muscles. Nevertheless, the increased β -dystroglycan levels were not correlated with dystrophic muscle protection, as is the case of the extraocular muscles,^{45,49} since no morphological improvement was observed for the sternomastoid, TA or cardiac muscle despite significantly decreased CK levels.

In conclusion, our results show that verapamil and diltiazem, drugs used to decrease intracellular calcium levels, improve the dystrophic phenotype of *mdx* mice as demonstrated by decreased serum CK levels and reduced muscle degeneration of the main affected muscle, the diaphragm. Diltiazem appears to be more effective in protecting muscle degeneration. These results suggest that L-type Ca^{2+} channels are involved in the genesis of dystrophic muscle degeneration and might be a target for the treatment of the main affected muscles. The present data also suggest that the different effects of calcium channel blockers involving their membrane

interactions with the sarcoplasmic reticulum and sarcolemma may contribute to the improvement of the dystrophic phenotype.

REFERENCES

1. BULFIELD, G., SILLER, W.G., WIGHT, P.A.L., MOORE, K.J. X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. **Proc Natl Acad Sci USA**. v.81, p.1189-1192, 1984.
2. TANABE, Y., ESAKI, K., NOMURA, T. Skeletal muscle pathology in X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) mouse. **Acta Neuropathol** v.69(1-2), p.91-95, 1986.
3. ERVASTI, J.M., OHLENDIECK, K., KAHL, S.D., GAVER, M.G., CAMPBELL, K. Deficiency as a glycoprotein component of the dystrophin complex in dystrophic muscle. **Nature**. v.345, p.315-319, 1990.
4. ERVASTI, J.M., CAMPBELL, K.P. A role for the dystrophin-glycoprotein complex as a transmembrane linker between laminin and actin. **J Cell Biol**. v.122, p.809-823, 1993.
5. BERTORINI, T.E., BHATTACHARYA, S.K., PALMIERI, G.M., CHESNEY, C.M., PIFER, D., BAKER, B. Muscle calcium and magnesium content in Duchenne muscular dystrophy. **Neurology**. v.32, p.1088-1092, 1982.
6. WHITEHEAD, N.P., YEUNG, E.W., ALLEN, D.G. Muscle damage in *mdx* (dystrophic) mice: role of calcium and reactive oxygen species. **Clin Exp Pharmacol Physiol**. v.33, p.657-662, 2006.
7. WELLS, D.J. Therapeutic restoration of dystrophin expression in Duchenne muscular dystrophy. **J Muscle Res Cell Motil**. v.27, p.387-398, 2006
8. GROUNDS, M.D., TORRISI, J. Anti-TNF α (Remicade®) therapy protects dystrophic skeletal muscle from necrosis. **FASEB J**. v.18, p.676-682, 2004.

9. TIDBALL, J.G., WEHLING-HENRIKS, M. Evolving therapeutics strategies for Duchenne muscular dystrophy: targeting downstream events. **Pediatr Res.** v. 56, p.831– 841, 2004.
10. MARQUES, M.J., LUZ, M.A.M., MINATEL, E., SANTO NETO, H. Muscle regeneration in dystrophic *mdx* mice is enhanced by isosorbide dinitrate. **Neurosci Lett.** v.382, p.342–345, 2005.
11. MARQUES, M.J., MACHADO, R.V., MINATEL, E., SANTO NETO, H. Disodium cromoglycate protects dystrophin-deficient muscle fibers from leakiness: studies in *mdx* sternomastoid, diaphragm and tibialis anterior. **Muscle Nerve.** 2008.
12. TURNER, P.R., FONG, P., DENETCLAW, W., STEINHARDT, R.A. Increase calcium influx in dystrophic muscle. **J Cell Biol.** v.115(6), p.1701-1712, 1991.
13. BROWN, S.C., LUCY, J.A. Functions of dystrophin. In: Brown, S.C., Lucy, J.A., editors. Dystrophin, gene, protein and cell biology. Cambridge University Press. p. 163-200, 1997.
14. MALLOUK, N., JACQUEMOND, V., ALLARD, B. Elevated subsarcolemmal Ca^{2+} in *mdx* mouse skeletal muscle fibers detected with Ca^{2+} -activated K^{+} channels. **Proc Natl Acad Sci USA.** v.97, p.4950-4955, 2000.
15. ROBERT, V., MASSIMINO, M L., TOSSELO, V., MARSAULT, R., CANTINI, M., SORRENTINO, V. Alterations in calcium handling at the subsarcolemmal level in *mdx* myotubes. **J Biol Chem.** v.276, p.4647-4651, 2001.
16. FRANCO-OBREGON JR, A., LANSMAN, JB. Mechanosensitive ion channels in skeletal muscle from normal and dystrophic mice. **J Physiol.** v.481,p.299-309, 1994.
17. VANDEBROUCK, A., MARTIN, D., COLSON-VAN SCHOOR, M., DEBAIX, H., GAILLY, P. Involvement of TRPC in the abnormal calcium influx observed in dystrophic (*mdx*) mouse skeletal muscle fibers. **J Cell Biol.** v.158, p.1089-1096, 2002.

18. VANDEBROUCK, A., SABOURIN, J., RIVET, J., BALGHI, H., SEBILLE, S, KITZIS, A., RAYMOND, G., COGNARD, C., BOURMEYSTER, N., CONSTANTIN, B. Regulation of capacitative calcium entries by $\alpha 1$ -syntrophin: association of TRPC1 with dystrophin complex and the PDZ domain of $\alpha 1$ -syntrophin. **FASEB J.** v.21, p.608-617, 2007.
19. CULLIGAN, K., BANVILLE, N., DOWLING, P., OHLENDIECK, K. Drastic reduction of calsequestrin-like proteins and impaired calcium binding in dystrophic mdx muscle. **J Appl Physiol.** v.92, p.435-445, 2002.
20. DORAN, P., DOWLING, P., DONOGHUE, P., BUFFINI, M., OHLENDIECK, K. Reduced expression of regucalcin in young and aged mdx diaphragm indicates abnormal cytosolic calcium handling in dystrophin-deficient muscle. **Biochem Biophys Acta.** v.1764, p.773-785, 2006.
21. GILMAN, A.G., RALL, T.W., NIES, A.S., TAYLOR, P. **As bases farmacológicas da terapêutica.** 8th edn., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan. p.1232, 1991.
22. JANIS, R.A., SILVER, P.J., TRIGGLE, D.J. Drug Action and cellular calcium regulation. **Adv Drug Res.** v.16, p.309-591, 1987.
23. JOHNSON, P.L., BHATTACHARYA, S.K. Regulation of membrane-mediated chronic muscle degeneration in dystrophic hamsters by calcium-channel blockers – diltiazem, nifedipine and verapamil. **J Neurol Sci.** v.115(1), p.76-90, 1993.
24. IWATA, Y., KATANOSAKA, Y., SHIJUN, Z., KOBAYASHI, Y., HANADA, H., SHIGEKAHA, M., WAKABAYASHI, S. Protective effects of Ca^{2+} handling drugs against abnormal Ca^{2+} homeostasis and cell damage in myopathic skeletal muscle cells. **Biochem Pharmacol.** v.70, p.740-751, 2005.

25. PERNICE, W., BECKMANN, R., KETELSEN, U.P., FREY, M., SCHMIDT-REDEMANN, B., HAAP, K.P., ROEHREN, R., SAUER, M. A double-blind placebo controlled trial of diltiazem in Duchenne dystrophy. **Klin Wochenschr.** v.66, p.565-570, 1988.
26. BERTORINI, T.E., PALMIERI, G.M.A., GRIFFIN, J.W., IGARASHI, M., MCGEE, J., BROWN, R., NUTTING, D.F., HINTON, A.B., KARAS, J.G. Effect of chronic treatment with the calcium antagonist diltiazem in Duchenne muscular dystrophy. **Neurology.** v.38, p.609-613, 1988.
27. PORTER, J.D., MERRIAN, A.P., LEAHY, P., GONG, B., KHANNA, S. Dissection of temporal gene expression signatures of affected and spared muscle groups in dystrophin-deficient (mdx) mice. **Hum Mol Genet.** v.12(15), p.1813-1821, 2003.
28. LEFAUCHEUR, J.P., PASTORET, C., SEBILLE, A. Phenotype of dystrophinopathy in old mdx mice. **Anat Rec.** v.242, p.70-76, 1995.
29. HAMER, P.W., MCGEACHIE, J.M., DAVIES, M.J., GROUNDS, M.D. Evans blue dye an in vivo marker of myofibre damage: optimising parameters for detecting initial myofibre membrane permeability. **J Anat.** v.200, p.69-79, 2002.
30. ENGEL, A.G., YAMAMOTO, M., FISCHBECK, K.H. Dystrophinopathies. In: Engel, AG, Franzini-Armstrong, C, editors **Myology.** New York: McGraw-Hill; v.2, p.1133-1187, 1994. ISBN 0070195595.
31. LEFKOWITZ, D.L., LEFKOWITZ, S.S. Fascioscapulohumeral muscular dystrophy: A progressive degenerative disease that responds to diltiazem. **Med hypotheses.** v.65, p.716-721, 2005.
32. PETROF, B.J., SHRAGER, J.B., STEDMAN, H.H., KELLY, A.M., SWEENEY, H.L. Dystrophin protects the sarcolemma from stresses developed during muscle contraction. **Proc Natl Acad Sci USA.** v.90, p.3710-3714, 1993.

33. STRAUB, V., RAFAEL, J.A., CHAMBERLAIN, J.S., CAMPBELL, K.P. Animal models for muscular dystrophy show different patterns of sarcolemma disruption. **J Cell Biol.** v.139(2), p.375-385, 1997.
34. GROUNDS, M.D., SOROKIN, L., WHITE, J. Strength at the extracellular matrix-muscle interface. **Scand J Med Sci Sports.** v.15, p.381-391, 2005.
35. FONG, P.Y., TURNER, P.R., DENETCLAW, W.F., STEINHARDT, R.A. Increased activity of calcium leak channels in myotubes of Duchenne human and *mdx* mouse origin. **Science.** v.250, p.673-676, 1990.
36. YOSHIDA, M., YONETANI, A., SHIRASAKI, T., WADA, K. Dietary NaCl supplementation prevents muscle necrosis in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.** v.290(2), p.R449-R455, 2006.
37. HOPF, F.W., REDDY, P., HONG, J., STEINHARDT, R.A. A capacitative calcium current in cultured skeletal muscle cells is mediated by the calcium-specific leak channel and inhibited by dihydropyridine compounds. **J Biol Chem.** v.271, p.358-367, 1996.
38. DEHPOUR, A.R., MOUSAVIZADETH, K., GERAYESSH-NEJAD, S. Calcium release by diltiazem from isolated sarcoplasmic reticulum of rabbit skeletal muscle. **Gen Pharmacol.** v.31, p.463-468, 1998.
39. BEARD, N.A., SAKOWSKA, M.M., DULHUNTY, A.F., LAVER, D.R. Calsequestrin is an inhibitor of skeletal muscle ryanodine receptor calcium release channels. **Biophys. J.** v.82, p.310-320, 2002.
40. WANG, T., TSAI, L.I., SCHWARTZ, A. Effects of Verapamil, Diltiazem, Nisoldipine and Felodipine on Sarcoplasmic-Reticulum. **Eur J Pharmacol.** v.100(3-4), p.253-261, 1984.
41. POZZAN, T., RIZZUTO, R., VOLPE, P., MELDOLESI, J. Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores. **Physiol Rev.** v.74(3), p.595-636, 1994.

42. BEARD, N.A., LAVER, D.R., DULHUNTY, A.F. Calsequestrin and the calcium release channel of skeletal and cardiac muscle. **Prog Biophys Mol Biol.** v.85, p. 33-69, 2004.
43. COHN, R.D. Dystroglycan: important player in skeletal muscle and beyond. **Neuromuscul Disord.** v.15, p.207-217, 2005.
44. BARRESI, R., CAMPBELL, K.P. Dystroglycan: from biosynthesis to pathogenesis of human disease. **J Cell Sci.** v.119, p.199-207, 2006.
45. DOWLING, P., LOHAN, J., OHLENDIECK, K. Comparative analysis of Dp427-deficient mdx tissues shows that the milder dystrophic phenotype of extraocular and toe muscle fibres is associated with a persistent expression of beta-dystroglycan. **Eur J Cell Biol.** v.82, p.222–230, 2003.
46. GRAMOLINI, A.O., BARTON, E.A., TINSLEY, J.M., FERRIS, M.J., CARTAUD, A., CARTAUD, J., DAVIES, K.E., LUNDE, J.A., JASMIM, B.J. Muscle and neural isoform of agrin increase utrophin expression in cultured myotubes via a transcriptional regulatory mechanism. **J Biol Chem.** v. 273, p. 736-743, 1998.
47. COURDIER-FRUTH, L., BARMAN, L., WETTSTEIN, P., MEIER, F. Detection of glucocorticoid-like activity in traditional Chinese medicine used for the treatment of Duchenne muscular dystrophy. **Neuromuscul disord.** v.13, p. 699-704, 2003.
48. VOISIN, V, SÉBRIÉ, C., MATECKI, S., YU, H., GILLET, B., RAMONATXO, M., ISRAËL, M., PORTE, S. L-arginine improves dystrophic phenotype in mdx mice. **Neurobiol of dis.** v. 20(1), p.123-130, 2005.
49. PERTILLE, A., CARVALHO, C.L.T., SANTO NETO, H., MARQUES, M.J. Increased expression of calcium-binding proteins in extraocular muscles of dystrophin-deficient mdx mice: potential role in muscle sparing. **Neuromuscul Disord**, *submitted*.

Table 1

Effect of diltiazem and verapamil on blood creatine kinase levels in *mdx* mice.

Creatine kinase (U/L)	
C57Bl/10	75.55 ± 43.90
<i>Mdx</i>	573.13 ^a ± 245.21
Diltiazem	161.36 ^b ± 53.47
Verapamil	216.95 ^b ± 57.00

Values are expressed as mean ± SD (n=5 mice/group). C57Bl/10: control mice for *mdx*. *Mdx*: saline-treated *mdx* mice. Diltiazem and verapamil: drug-treated *mdx* mice. ^aSignificantly different from C57Bl/10 ($P \leq 0.05$, Student *t*-test). ^bSignificantly different from *mdx* and treated mice ($P \leq 0.05$, Student *t*-test).

Table 2

Effect of diltiazem and verapamil on the percentage of muscle fibers with peripheral cell nuclei (PN), centrally located nuclei (CN) and fibers stained with Evans blue dye (EBD).

		%PN	%CN	%EBD
STN	<i>mdx</i>	48.26 ± 11.22	50.73 ± 11.85	1.01 ± 2.45
	diltiazem	53.81 ± 9.69	43.14 ± 10.42	3.05 ± 3.67
	verapamil	43.58 ± 6.51	54.39 ± 7.68	2.03 ± 2.33
TA	<i>mdx</i>	51.80 ± 10.17	46.43 ± 10.07	1.73 ± 2.88
	diltiazem	57.40 ± 8.37	40.99 ± 8.78	1.61 ± 2.97
	verapamil	53.80 ± 8.53	45.41 ± 8.46	0.79 ± 0.82
Diaphragm	<i>mdx</i>	71.98 ± 9.29	20.87 ± 5.80	7.14 ± 5.59
	diltiazem	86.72* ± 3.94	12.19* ± 3.34	1.09* ± 0.67
	verapamil	79.90 ± 10.69	17.61 ± 10.70	2.49 ± 1.48

Values are expressed as the percentage (mean ± SD; n=5 mice/group) of the total number of fibers in sternomastoid (STN), tibialis anterior (TA) and diaphragm muscles. *Mdx*: mice injected with saline instead of diltiazem or verapamil. *Significantly different from *mdx* and diltiazem-treated mice ($P \leq 0.05$, Student *t*-test).

Figure legends

Figure 1

Effect of diltiazem and verapamil on total calcium content in the sternomastoid (STN), tibialis anterior (TA), diaphragm and heart muscles of control, *mdx*, diltiazem-treated and verapamil-treated mice. ^ASignificantly different from C57Bl/10 and *mdx* mice ($P \leq 0.05$, Student *t*-test).

^BSignificantly different from *mdx* and diltiazem-treated mice ($P \leq 0.05$, Student *t*-test).

^CSignificantly different from *mdx* and verapamil-treated mice ($P \leq 0.05$, Student *t*-test).

Figure 2

Histological appearance of the diaphragm (A), tibialis anterior (B) and sternomastoid (C-F) muscles of diltiazem- (A) and verapamil-treated *mdx* mice (B-F). In A, observe the Evans blue dye-positive myofibers (arrows) indicating sarcolemmal leakage (200x). In B, central nucleated fibers (arrow) and fibers with peripheral cell nuclei. In C, a representative inflammation/regeneration area is indicated by the dashed outline. D, Detail of the inflammation/regeneration area showing inflammatory cells and myotubes (arrows). E, Regeneration area indicated by the dashed line. F, Detail of the regeneration area showing myotubes and myofibers (arrows) with a small diameter and poor inflammatory cell infiltration. Myotubes-myofibers are seen as plump basophilic cells with at least one centrally located nucleus.

Figure 3

western blot analysis of β -dystroglycan in crude extracts of sternomastoid (A), tibialis anterior (B), diaphragm (C) and heart (D) muscles from C57Bl/10, *mdx*, diltiazem-treated and verapamil-treated *mdx* mice. Western blots and graphic representations are shown. ^aSignificantly different

from control and *mdx* mice ($P \leq 0.05$, Student *t*-test). ^bSignificantly different from *mdx* and diltiazem-treated mice ($P \leq 0.05$, Student *t*-test). ^cSignificantly different from *mdx* and verapamil-treated mice ($P \leq 0.05$, Student *t*-test).

Figure 4

Western blot analysis of calsequestrin in crude extracts of sternomastoid (A), tibialis anterior (B) and diaphragm (C) muscles from C57Bl/10, *mdx*, diltiazem-treated and verapamil-treated *mdx* mice. Western blots and graphic representations are shown. ^bSignificantly different from *mdx* and diltiazem-treated mice ($P \leq 0.05$, Student *t*-test).

^cSignificantly different from *mdx* and verapamil-treated mice ($P \leq 0.05$, Student *t*-test).

Figures

Figure 1

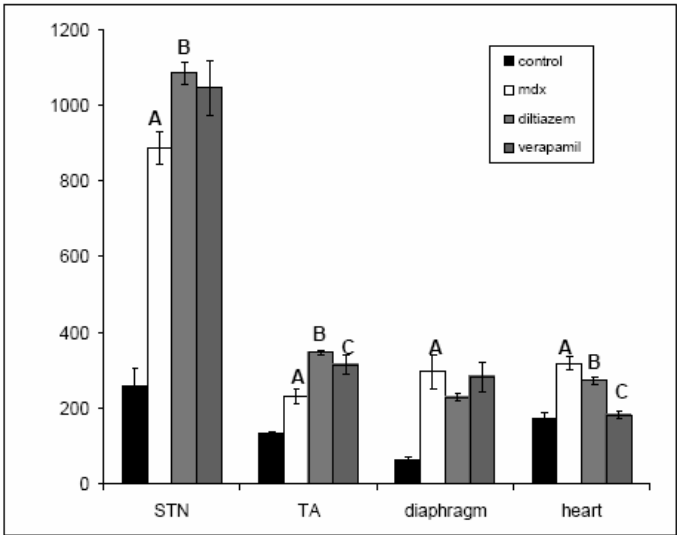


Figure 2

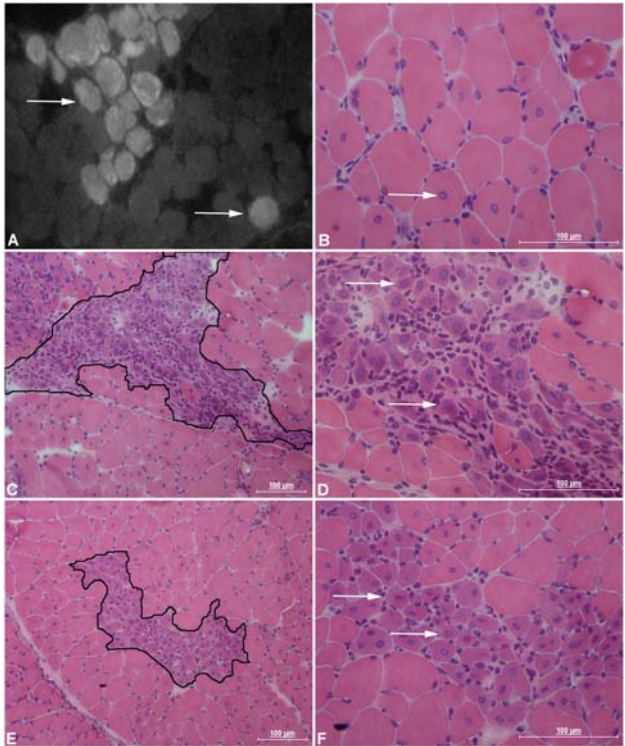


Figure 3

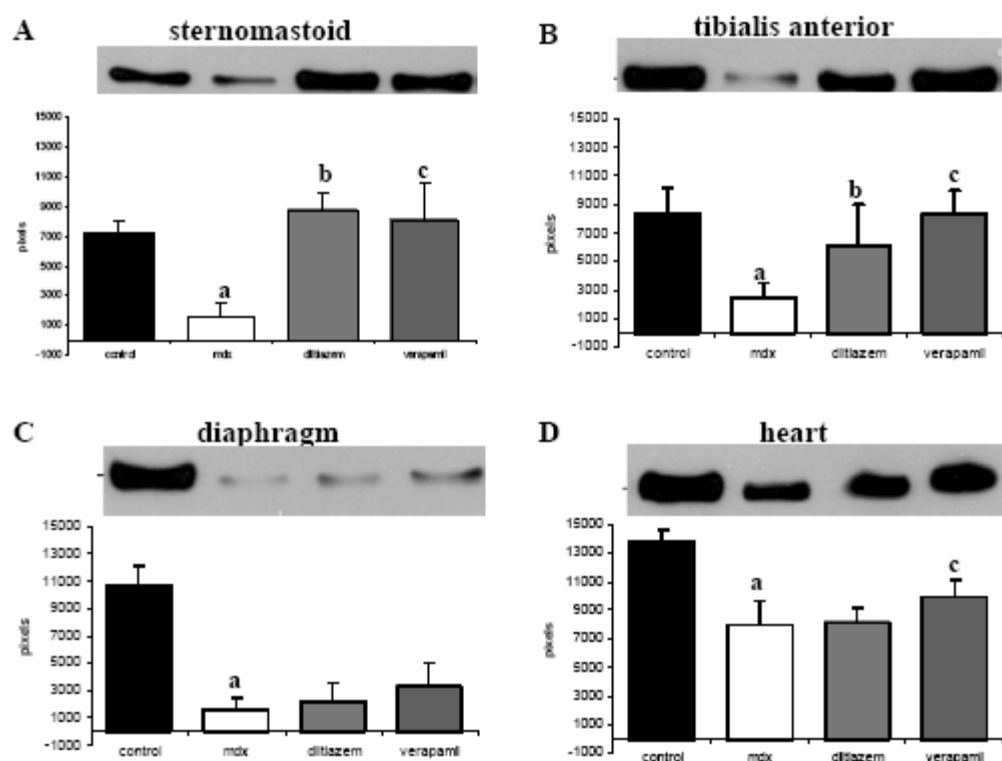
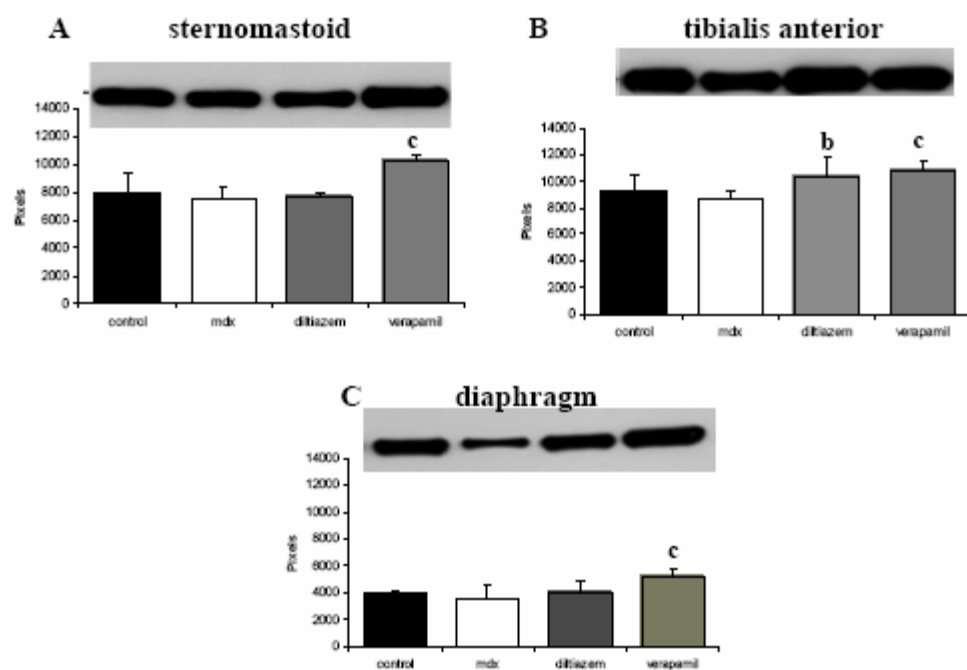
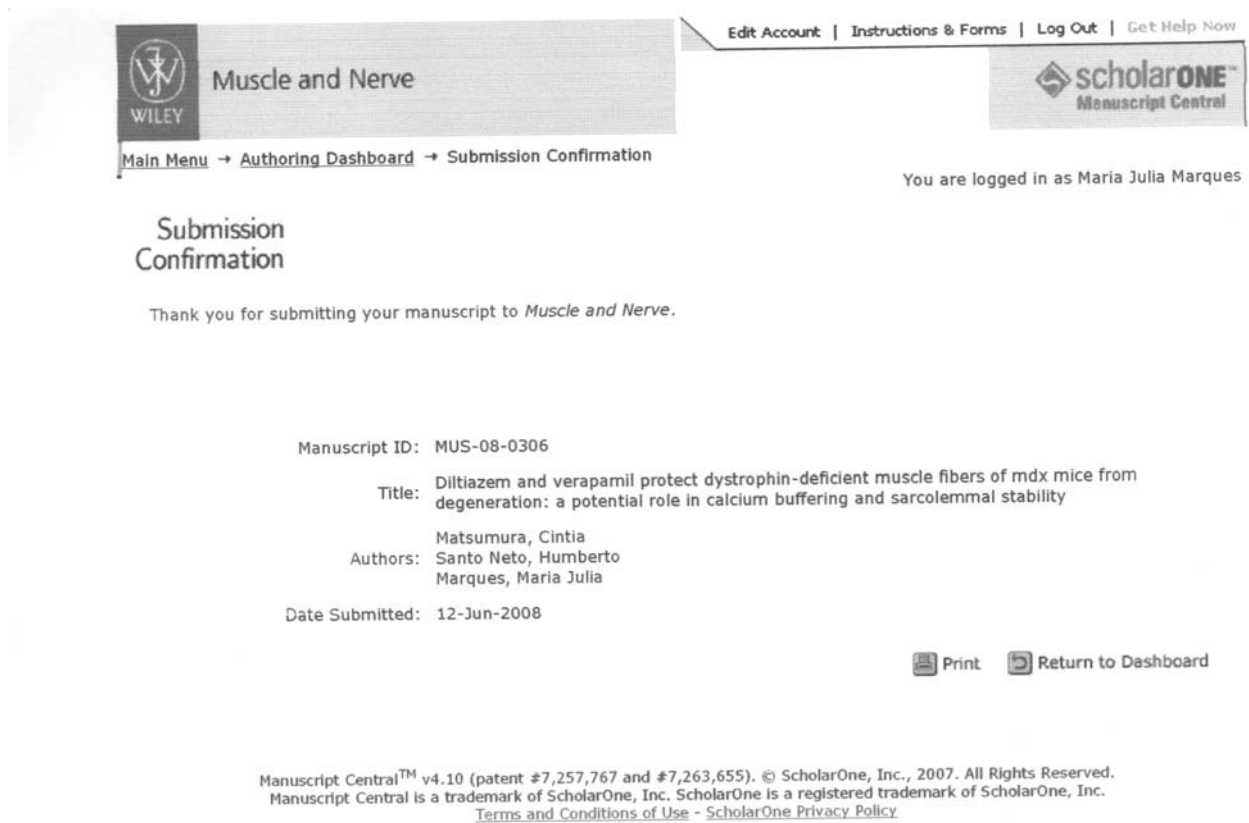


Figure 4



9. ANEXOS

Anexo 1: Confirmação da submissão para revista *Muscle and Nerve* do trabalho intitulado “Diltiazem and verapamil protect dystrophin-deficient muscle fibers of mdx mice from degeneration: a potencial role in calcium buffering and sarcolemmal stability”.



The screenshot shows the 'Submission Confirmation' page on the Muscle and Nerve Manuscript Central website. The header includes the Wiley logo, the journal title 'Muscle and Nerve', and navigation links: 'Edit Account', 'Instructions & Forms', 'Log Out', and 'Get Help Now'. The ScholarOne Manuscript Central logo is also present. Below the header, a breadcrumb trail reads 'Main Menu → Authoring Dashboard → Submission Confirmation'. A message states 'You are logged in as Maria Julia Marques'. The main heading is 'Submission Confirmation', followed by a thank-you message: 'Thank you for submitting your manuscript to *Muscle and Nerve*.' The manuscript details are listed: Manuscript ID: MUS-08-0306; Title: Diltiazem and verapamil protect dystrophin-deficient muscle fibers of mdx mice from degeneration: a potential role in calcium buffering and sarcolemmal stability; Authors: Matsumura, Cintia, Santo Neto, Humberto, Marques, Maria Julia; Date Submitted: 12-Jun-2008. At the bottom right are 'Print' and 'Return to Dashboard' buttons. The footer contains copyright information for Manuscript Central v4.10 and links to 'Terms and Conditions of Use' and 'ScholarOne Privacy Policy'.

WILEY Muscle and Nerve

Edit Account | Instructions & Forms | Log Out | Get Help Now

scholarONE Manuscript Central

Main Menu → Authoring Dashboard → Submission Confirmation

You are logged in as Maria Julia Marques

Submission Confirmation

Thank you for submitting your manuscript to *Muscle and Nerve*.

Manuscript ID: MUS-08-0306

Title: Diltiazem and verapamil protect dystrophin-deficient muscle fibers of mdx mice from degeneration: a potential role in calcium buffering and sarcolemmal stability

Authors: Matsumura, Cintia
Santo Neto, Humberto
Marques, Maria Julia

Date Submitted: 12-Jun-2008

Print Return to Dashboard

Manuscript Central™ v4.10 (patent #7,257,767 and #7,263,655). © ScholarOne, Inc., 2007. All Rights Reserved.
Manuscript Central is a trademark of ScholarOne, Inc. ScholarOne is a registered trademark of ScholarOne, Inc.
[Terms and Conditions of Use](#) - [ScholarOne Privacy Policy](#)



CEEA-IB-UNICAMP

Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA-IB-UNICAMP

Certificamos que o Protocolo nº 1124-1, sobre "Influência de bloqueadores de canais de cálcio no processo de degeneração/regeneração muscular em camundongos distróficos mdx", sob a responsabilidade de Profa. Dra. Maria Julia Marques / Cintia Yuri Matsumura, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEa)-IB-UNICAMP em reunião de 29 de novembro de 2006.

We certify that the protocol nº **1124-1**, entitled " _____", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on **November 29, 2006**.

Campinas, 29 de novembro de 2006.

Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente

Fátima Alonso
Secretária

Executiva

Anexo 3: Declaração de autorização da Comissão de Ética na Experimentação Animal, Instituto de Biologia – UNICAMP.

DECLARAÇÃO

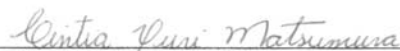
Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha Tese de Mestrado intitulada “Influência de bloqueadores de canais de cálcio no processo de degeneração/regeneração muscular em camundongos distróficos *mdx*”

() não se enquadra no Artigo 1º, § 3º da Informação CCPG 002/06, referente a bioética e biossegurança.

() está inserido no Projeto CIBio (Protocolo nº _____), intitulado _____

(X) tem autorização da Comissão de Ética em Experimentação Animal (Protocolo nº 1124-1).

() tem autorização do Comitê de Ética para Pesquisa com Seres Humanos (?) (Protocolo nº _____).


Aluna: Cintia Yuri Matsumura


Orientadora: Prof. Dra. Maria Julia Marques

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido () Indeferido


Nome: _____
Função: _____
Prof. Dra. ANAMARIA A. GUARALDO
Presidente
Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEa/IB - UNICAMP