

RAFAEL RAMOS DE BURGOS

**“INFLUÊNCIA DA NIFEDIPINA E DA COENZIMA Q10 NO
PROCESSO DE DEGENERAÇÃO/REGENERAÇÃO MUSCULAR
EM CAMUNDONGOS *MDX*”**

**CAMPINAS
2013**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

RAFAEL RAMOS DE BURGOS

**“INFLUÊNCIA DA NIFEDIPINA E DA COENZIMA Q10 NO
PROCESSO DE DEGENERAÇÃO/REGENERAÇÃO MUSCULAR
EM CAMUNDONGOS *MDX*”**

Este exemplar corresponde à redação final
da Dissertação defendida pelo candidato

Rafael Ramos de Burgos

e aprovada pela Comissão Julgadora.

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

Orientadora: Profa. Dra. Elaine Minatel

**CAMPINAS,
2013**

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

B915i Burgos, Rafael Ramos de, 1981-
Influência da nifedipina e da coenzima Q10 no processo de
degeneração/regeneração muscular em camundongos *mdx* / Rafael Ramos de
Burgos. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Elaine Minatel.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de
Biologia.

1. Camundongos endogâmicos *mdx*. 2. Canais de cálcio. 3. Antioxidantes. 4.
Nifedipina. 5. Ubiquinona. I. Minatel, Elaine, 1976-. II. Universidade Estadual de
Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: The influence of nifedipine and coenzyme Q10 on muscle
degeneration/regeneration process in *mdx* mice

Palavras-chave em inglês:

Mice, inbred *mdx*

Calcium channels

Antioxidants

Nifedipine

Ubiquinone

Área de concentração: Anatomia

Titulação: Mestre em Biologia Celular e Estrutural

Banca examinadora:

Elaine Minatel [Orientador]

Elaine Cristina Leite Pereira

Gustavo Ferreira Simões

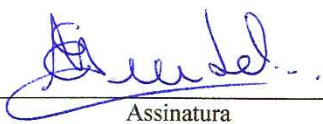
Data de defesa: 16-07-2013

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural

Campinas, 16 de julho de 2013

BANCA EXAMINADORA

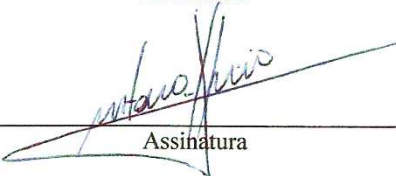
Profª. Dra. Elaine Minatel (Orientadora)


Assinatura

Profª. Dra. Elaine Cristina Leite Pereira


Assinatura

Prof. Dr. Gustavo Ferreira Simões


Assinatura

Profª. Dra. Adriana Pertille


Assinatura

Profª. Dra. Cíntia Yuri Matsumura


Assinatura

*“À minha família,
em especial a minha mulher Camila e meu filho Lucas,
por vocês e com vocês, tudo é possível”*

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural.

Aos meus pais, José Aloysio e Nilda, sem vocês eu certamente não teria chegado até aqui.

À família Gannuny, pelo apoio incondicional.

Sra. Liliam Panagio, pela orientação, eficiência e precisão no auxílio documental dessa dissertação.

Aos meus colegas de lab, Aline, Daniela, Priscyla e Túlio por ajudar a tornar as reuniões e convivência sempre muito produtivas, além de muito divertidas.

A minha parceira de pesquisa, Amanda Harduim, sua participação foi essencial e você é parte desse trabalho.

Ao amigo, mestre e doutorando, Luis Henrique Rapucci, pela amizade, pela paciência e pela forma serena que me ensinou e me ajudou. Estendo para sua esposa, Fernanda Rapucci, os meus mais sinceros agradecimentos pela sincera amizade. Isso não tem valor...

A TODOS os alunos da PG da Anatomia. Cada pequena contribuição, somadas, tornaram a minha formação maior.

Sr. Toni, Srs. “Paulos”, Sr. Walter pelo apoio nas aulas de anatomia e preparação de peças.

Sr. Nori, e Sr. Marquinhos, obrigado pelo suporte nos laboratórios.

Aos professores Dr. Angelo, Dra. Valéria, Dra. Maria Julia e Dr. Humberto pelos amplos ensinamentos sobre os conceitos fundamentais da anatomia humana e minha preparação para a docência.

Ao prof. Dr. Eduardo Caldeira, você sabe o quanto ajudou a mim e minha família.

A profa. Dra. Elaine Minatel, por todos os ensinamentos, amizade e forma gentil com a qual sempre fui recebido, ouvido e acolhido. Tive sorte em tê-la como orientadora. O que aprendi com você ficará sempre comigo. Obrigado.

A minha mulher Camila, minha confidente, companheira, parceira de todas as horas e momentos.

Sempre estaremos juntos. Amo você.

Ao meu filho Lucas, por ter me deixado dormir a noite e por ter me proporcionado toda a felicidade que tenho a cada sorriso seu. Obrigado por ter me escolhido como seu pai.

“Emancipate yourselves from mental slavery,
None but ourselves can free our minds”

Bob Marley

SUMÁRIO

ABREVIATURAS	1
RESUMO	3
ABSTRACT	5
1. INTRODUÇÃO	6
1.1 Apresentação	6
1.2 Distrofia Muscular de Duchene (DMD)	9
1.2.1 Diagnóstico e progressão clínica da DMD	9
1.2.2 Patogênese da DMD	10
1.3 Camundongos <i>mdx</i>	12
1.4 Cálcio, canais de cálcio e drogas bloqueadoras de cálcio	14
1.4.1 Nifedipina	16
1.5 Espécies reativas de oxigênio (EROs)	18
1.5.1 Antioxidante Coenzima Q10	21
2. OBJETIVO	23
3. MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1 Animais	24
3.2 Drogas e Tratamento	25
3.3 Análise Histológica	25
3.4 Determinação da Atividade de Creatina-Quinase (CK)	27
3.5 Quantificação de TNF- α , NF- κ B e 4-HNE	27
3.6 Determinação de cálcio total nos músculos	28
3.7 Análise Estatística	29
4. RESULTADOS	30
4.1 Peso corporal	30
4.2 Análise de creatino-quinase (CK) no plasma sanguíneo	30
4.2 Análise morfológica qualitativa e quantitativa	31
4.3 Análise do Western Blotting	36
4.3.1 4-HNE	36
4.3.2 TNF-alpha	38
4.3.3 NF-kB	39

4.3 Determinação de cálcio total nos músculos	41
5. DISCUSSÃO	43
5.1 Efeitos Colaterais	43
5.2 Degeneração/Regeneração muscular	44
5.3 Resposta Inflamatória	47
5.4 Antioxidante	50
5.5 Cálcio	51
5.6 Qual o melhor tratamento?.....	52
6. CONCLUSÃO	55
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56
ANEXO	71

ABREVIATURAS

4-HNE – 4-hidroxinonenal

ADP – difosfato de adenosina

AE – azul de Evans

ATP – trifosfato de adenosina

CDG – complexo distrofina-glicoproteínas

CK – enzima creatina-quinase

CTRL – controle

DIA – músculo diafragma

DMD – distrofia muscular de Duchenne

EROs – espécies reativas de oxigênio

GAPDH – gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

H₂O₂ – peróxido de hidrogênio

HE – hematoxilina-eosina

IL-1 β – interleucina 1 β

Infl/Reg – área de inflamação / regeneração

MDA – malondialdeído

mdx – X chromosome-linked muscular dystrophy

mdxN – camundongo *mdx* tratado com Nifedipina

mdxCo – camundongo *mdx* tratado com Coenzima Q10

mdxNCo – camundongo *mdx* tratado com associação de Nifedipina e Coenzima Q10

NAC – N-acetilcisteína

NADPH – nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NC – núcleo central

NF-KB – fator de transcrição nuclear

nNOS – óxido nítrico sintase neuronal

NO – óxido nítrico

Ni – Nifedipina

CoQ10 – Coenzima Q10

NP – núcleo periférico

OH. – radical hidroxila

Reg – área de regeneração

SAC – canal de cálcio ativado por estiramento

STN – músculo esternomastóideo

TA – músculo tibial anterior

TNF- α – fator de necrose tumoral alpha

RESUMO

Tratamentos com antioxidantes e bloqueadores de canais de cálcio têm apresentado resultados positivos na diminuição da mionecrose nas fibras musculares distróficas. O objetivo do presente projeto foi verificar se o tratamento com o bloqueador de cálcio Nifedipina (Ni) e o antioxidante Coenzima Q10 (CoQ10), administrados isoladamente ou em associação antes que se iniciem os ciclos de degeneração/regeneração muscular, pode apresentar efeito benéfico sobre as fibras musculares distróficas de camundongos *mdx*, modelo experimental da distrofia muscular de Duchenne. Camundongos *mdx* com 14 dias de vida pós-natal foram divididos em 4 grupos experimentais: (1) tratados com álcool 20% e solução aquosa 1% de Tween 80; (2) tratados com a associação de Ni e CoQ10; (3) tratados com Ni isoladamente; (4) e tratados com somente CoQ10. Camundongos da linhagem C57BL/10 foram usados como controle. Os músculos tibial anterior (TA), diafragma (DIA) e esternomastóideo (STN) foram retirados e utilizados para quantificar: (1) o número de fibras em degeneração, regeneradas e normais; (2) o nível de TNF- α , NF- κ B e 4-HNE; (3) o conteúdo de cálcio total; e (4) a área de inflamação muscular. Amostras de sangue foram utilizadas para determinação dos níveis creatina quinase (CK). Os animais tratados com Ni apresentaram: redução significativa de fibras em degeneração no músculo TA, redução nos níveis de TNF- α em todos os músculos analisados e no conteúdo de NF- κ B e cálcio no músculo DIA. Animais *mdx* tratados com Coenzima Q10 mostrou redução: CK, TNF- α no músculo TA, no conteúdo de NF- κ B nos músculos DIA e STN, na área de inflamação no músculo DIA e determinação do cálcio nos músculos DIA e STN. A associação dos tratamentos demonstrou redução significativa na análise de CK, no TNF- α do músculo TA, na área de inflamação, conteúdo do NF- κ B e cálcio no músculo DIA. O conjunto dos resultados sugere que a Ni e a CoQ10 possam ser potencialmente úteis para o tratamento farmacológico da distrofinopatias. Entretanto, estudos futuros da dosagem e do tempo de tratamento serão necessários para obtenção de

efeitos benéficos mais significativos sobre os músculos distróficos.

Palavras Chaves: camundongo *mdx*, canais de cálcio, antioxidantes, Nifedipina, Ubiquinona.

ABSTRACT

Treatment using antioxidant and calcium channel blockers have shown positive results for myonecrosis decrease in dystrophic muscle fibers. The aim of this study is to verify if treatment with Nifedipine (Ni) calcium channel blocker and Coenzyme Q10 (CoQ10) antioxidant, administered alone or in association before degeneration/regeneration cycles take place, may have a beneficial effect on dystrophic muscle fibers in *mdx* mice, which are the experimental model for Duchenne's dystrophy. *Mdx* mice at 14 days old were divided into 4 experimental groups: (1) treated with 20% alcohol and 1% Tween 80 water solution; (2) treated with an association of Ni and CoQ10; (3) treated with Ni alone; and (4) treated with CoQ10 alone. C57BL/10 mice were used as a control. The tibialis anterior (TA), diaphragm (DIA) and sternomastoid (STN) muscles were removed and used for quantification of: (1) number of degenerated, regenerated and wild-type fibers; (2) TNF- α , NF- κ B and 4-HNE levels; (3) total amount of calcium; and (4) muscle inflammation area. Creatine kinase (CK) was analyzed from a blood sample. The animals treated with Ni showed: a significant decrease of degenerated muscle fibers in the TA muscle, a reduced TNF- α level in all muscles analyzed and lower levels of NF- κ B and calcium in the DIA muscle. *Mdx* mice treated with Coenzyme Q10 presented a decrease of the following: CK expression, TNF- α level in the TA muscle, NF- κ B level in the DIA and STN muscles, inflammation area in the DIA muscle and calcium content in the DIA and STN muscles. The association of both drugs showed a significant reduction of CK in the blood, TNF- α in the TA muscle, and also a reduction of the inflammation area, the NF- κ B expression and the calcium content of the DIA muscle. Overall results suggest that Ni and CoQ10 may play a potential role as a pharmacological treatment for dystrophinopathies. However, further studies must be carried out for both dosage and treatment period to obtain more significant beneficial effects on dystrophic muscles.

Key-words: *mdx* mice, calcium channels, antioxidants, Nifedipine, Ubiquinone

1. INTRODUÇÃO

1.1 Apresentação

As distrofias musculares compreendem um grupo heterogêneo de patologias geneticamente determinadas, caracterizadas por alterações degenerativas progressivas das fibras musculares, cuja principal manifestação é a fraqueza muscular progressiva (SCHMALBRUCH, 1984). A disfunção genética mais comum encontrada em crianças é a distrofia muscular de Duchenne (DMD). A DMD é uma doença recessiva ligada ao cromossomo X (locus Xp21), que acomete uma em cada 3500 crianças do sexo masculino, nascidas vivas (BIGGAR et al, 2002).

A doença foi descoberta há cerca de 150 anos e inicialmente foi descrita como paralisia muscular pseudo-hipertrófica (ENGEL; YAMAMOTO; FISHBECK, 1994). A doença afeta primariamente músculos esqueléticos e cardíacos e os primeiros sinais da doença aparecem em torno de 2 a 3 anos de idade, evoluindo com perda progressiva da musculatura, aumento do tecido conjuntivo fibroso intersticial e substituição das fibras musculares por tecido adiposo (SEIXAS et al, 1997). A maioria das crianças perde a capacidade de deambular no início da segunda década de vida, culminando com a insuficiência cárdio-respiratória entre 20 e 30 anos (BIGGAR et al, 2002).

A alteração genética ocorrida na DMD causa modificação do gene responsável pela codificação da proteína distrofina. 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 (PETROF, 2002; SPENCER; MELLGREN, 2002). A ausência da distrofina e de componentes do CDG prejudica esta conexão promovendo instabilidade do sarcolema durante os ciclos de contração e relaxamento. Dessa forma, ocorre influxo exacerbado de íons cálcio, hipercontração miofibrilar, ativação de proteases endógenas e necrose da fibra muscular (BIGGAR et al, 2002; BOGDANOVICH et al, 2004). Paralelamente a instabilidade sarcolemal,

estudos também sugerem que o funcionamento dos canais de cálcio também estaria prejudicado devido à ausência da distrofina contribuindo para o influxo exacerbado de cálcio intracelular (STRAUB et al, 1997).

Outro fator que contribui com a patogênese da DMD é o estresse oxidativo. O acúmulo intracelular de íons cálcio conduz a uma captação anormal deste pela mitocôndria, resultando em uma produção elevada de espécies reativas de oxigênio (EROs) (BROOKES et al, 2004). Outra possibilidade de mecanismo de formação de EROs é através da NADPH-oxidase (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, enzima catalisadora da redução monovalente do oxigênio usando NADPH como doador de elétron para formar um ânion superóxido), a qual se tem conhecimento que produz rapidamente EROs durante o ciclo de relaxamento das células musculares lisas (GROTE et al, 2003). Recentemente, constatou-se a presença de subunidades de NADPH-oxidase no músculo estriado esquelético junto ao sarcolema (JAVESGHANI et al, 2002). Whitehead, Yeung, Allen e colaboradores (2006) sugeriram que este complexo enzimático pode ser regulado pela distrofina ou por outras proteínas do CDG. Desta forma, sua função pode estar alterada nos músculos distróficos, levando a uma maior produção de EROs. Marcadores de estresse oxidativo foram identificados em músculos de pacientes distróficos e de camundongos *mdx*, modelo experimental da DMD (RAGUSA; CHOW; PORTER, 1997; RODRIGUEZ; TARNOPOLSKY, 2003). Outros trabalhos também indicam o envolvimento do estresse oxidativo na fisiopatologia da DMD. Dentre estes podemos destacar os que enfocam que as células musculares distróficas são mais susceptíveis as EROs (RANDO et al., 1998; DISATNIK et al., 1998); que os radicais livres contribuem para a perda da integridade da membrana nas distrofias musculares (MURPHY; KEHRER, 1989); redução da concentração de antioxidantes endógenos (glutathiona e vitamina E) e alterações na atividade de enzimas antioxidantes nas fibras musculares distróficas (RAGUSA; CHOW; PORTER, 1997; MURPHY; KEHRER, 1989).

Diante do exposto, levantamos a hipótese que o tratamento em conjunto de um bloqueador de cálcio com um antioxidante pode ter um potencial efeito terapêutico sobre a DMD.

1.2 Distrofia Muscular de Duchene (DMD)

1.2.1 Diagnóstico e progressão clínica da DMD

A doença tem uma história natural, que de uma maneira geral, atinge todos os acometidos de forma muito semelhante. Para que seja acompanhada e tratada de maneira adequada, o diagnóstico precisa ser realizado com maior precisão possível, onde a suspeita sobre uma criança com desenvolvimento motor atrasado ou histórico familiar é sempre o ponto de partida (BUSHBY et al, 2010).

Na DMD, as crianças usualmente requerem atenção especializada entre 3 a 5 anos de idade devido às quedas frequentes e por apresentarem corrida e marcha sem equilíbrio e balançante (WALTER; LOCHMÜLLER, 2007). Ainda neste período, os pacientes distróficos apresentam o sinal de Gowers (a criança só consegue levantar-se do chão utilizando as mãos para se “escalar”, indicando fraqueza proximal). Por volta dos 5 a 6 anos, os músculos tríceps sural, glúteos, vasto lateral, deltoide e infra-espal aumentam de volume pelo depósito de gordura e apresentam fraqueza concomitante (ENGEL; YAMAMOTO; FISCHBECK, 1994). A doença progride severamente e a capacidade de deambulação é perdida entre os 7 e 12 anos de idade (WALTER; LOCHMÜLLER, 2007; ENGEL; YAMAMOTO; FISCHBECK, 1994).

A morte ocorre geralmente pelo acometimento cardíaco ou respiratório aproximadamente aos 20 anos de idade. Com os avanços tecnológicos no tratamento, contudo, alguns indivíduos com DMD agora conseguem viver até o fim da segunda década de vida e às vezes um pouco além, apesar da sobrevivência após os 30 anos ser rara (D'ANGELO; GANDOSSINI, 2012).

1.2.2 Patogênese da DMD

A anormalidade genética da DMD está presente no braço curto do cromossomo X (locus Xp21.1), especificamente na sequência de nucleotídeos responsáveis pela expressão da proteína denominada distrofina (HOFFMAN et al, 1996). Como é transmitida hereditariamente por cromossomo X recessivo, quase todos os pacientes são do sexo masculino. Raramente, a doença se manifesta em meninas com Síndromes de Turner ou outras aberrações estruturais do cromossomo X (ENGEL; YAMAMOTO; FISCHBECK, 1994).

A distrofina é uma proteína citoesquelética subsarcolemal, com massa molecular relativa de 427 KDa que possui 3685 aminoácidos, conectada a um complexo de glicoproteínas, o complexo distrofina-glicoproteína (CDG). O CDG (Figura 1) é expresso em alta concentração no músculo estriado esquelético (RANDO, 2001; SUNADA; CAMPBELL, 1995) e apresenta múltiplas subunidades que atravessam o sarcolema e conectam a matriz extracelular ao citoesqueleto de actina. Fazem parte deste complexo as distroglicanas, as sintrofinas, as sarcoglicanas e as distrobevinas (para revisão ver RANDO, 2001; BIGGAR et al., 2002; LAPIDOS; KAKKAR; MCNALLY, 2004; MARQUES et al, 2004).

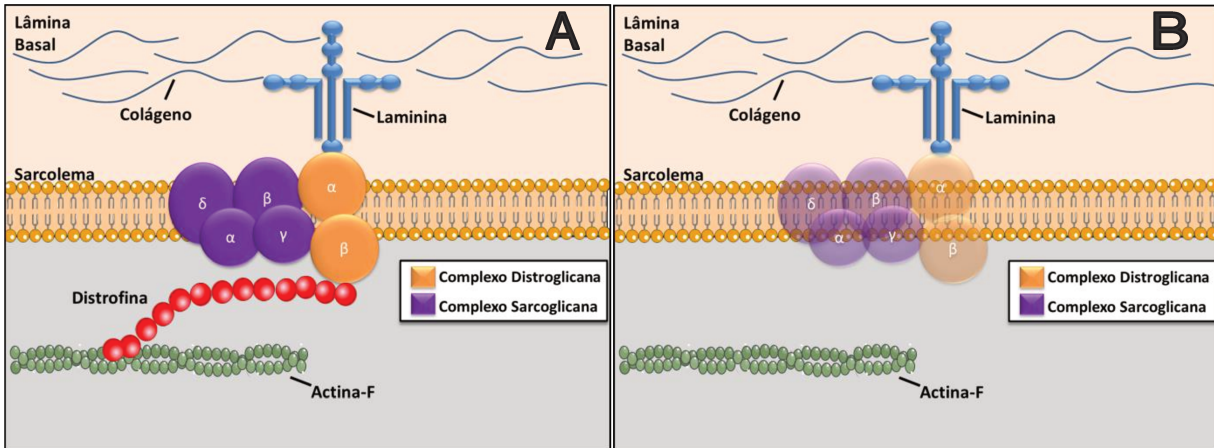


Figura 1. Diagrama mostrando a relação entre a distrofina, complexo protéico associado a distrofina, a superfície da membrana e a matrix extracelular. **A.** músculo normal. **B.** DMD.

Admite-se que a ausência da distrofina e de componentes do CDG promova instabilidade do sarcolema durante os ciclos de contração e relaxamento e alteração na atividade dos canais de cálcio (RANDO, 2001). Dessa forma, ocorre influxo exacerbado de íons cálcio, hipercontração miofibrilar, ativação de proteases endógenas e necrose da fibra muscular (BIGGAR et al, 2002; BOGDANOVICH et al, 2004). Inicia-se então um processo de regeneração muscular através da ativação de células satélites, que são células indiferenciadas quiescentes nos músculos esquelético dos adultos e estão sob a lâmina basal do miócito, que re-entram no ciclo celular da fibra quando ativadas por trauma, exercício ou lesão (SABOURIN; RUDNICKI, 2000). Em seguida, ocorre a formação e amadurecimento dos miotubos em fibras musculares, porém este é prejudicado ou insuficiente na DMD. Gradualmente os músculos são substituídos por gordura e tecido fibroso, o que justifica a perda da função observada nesses pacientes (HOLTERMAN; RUDNICKI, 2005).

1.3 Camundongos *mdx*

O estudo da compreensão dos aspectos da biologia dos músculos esqueléticos distróficos e dos mecanismos da DMD (STRAUB et al., 1997; YOSHIDA et al., 2006) são em grande parte realizados em modelos experimentais. O camundongo *mdx* (*X chromosome-linked muscular dystrophy*) é o modelo experimental mais utilizado e foi descrito inicialmente por Bulfield e colaboradores em 1984. Estudos genéticos demonstraram que nos camundongos *mdx* o gene afetado é homólogo ao dos pacientes com DMD. Tal como os humanos com DMD, os camundongos *mdx* apresentam deficiência na produção de distrofina nas suas fibras musculares, reproduzindo assim, as características das fibras musculares dos pacientes portadores de DMD (BULFIELD et al., 1984).

Apesar da ausência da distrofina ser um achado comum tanto nos pacientes portadores de DMD quanto nos camundongos *mdx*, a evolução do quadro clínico não é exatamente a mesma para cada um deles. Ultraestruturalmente há algumas diferenças evidentes entre a patologia dos camundongos *mdx* e da DMD. Desta forma, apesar dos camundongos apresentarem intenso infiltrado inflamatório nas áreas de mionecrose, diferem da distrofia humana por não apresentar fibrose intensa e depósito de tecido adiposo na maioria dos tecidos musculares esqueléticos; machos e fêmeas são afetados e os músculos do *mdx* regeneram sucessivamente após necrose (CULLEN; JAROS, 1988).

Nos músculos de camundongos *mdx* os ciclos de degeneração/regeneração se iniciam efetivamente por volta dos 20 dias de idade. Estudos mostraram que no sétimo dia pós-nascimento os camundongos apresentam cerca de 0,62% das fibras musculares do STN regeneradas. No décimo quarto e vigésimo primeiro dias, 2,2% e 5%, respectivamente, período caracterizado como estado pré-necrótico (MINATEL, NETO; MARQUES, 2003; PORTER et al., 2003). No período entre 21 e 28 dias de vida pós-natal, observa-se extensa área de necrose no músculo tibial anterior destes animais (SHAVLAKADZE et al., 2004). A intensa necrose miofibrilar, observada neste período, providencia

um excelente modelo para o estudo de intervenções terapêuticas designadas para prevenir ou reduzir a necrose, uma vez que a redução da miopatia é facilmente identificada (RADLEY ; GROUNDS, 2006). Entre 35 e 90 dias a necrose atinge seu ápice, comprometendo um grande número de fibras do extensor longo dos dedos. Neste período encontram-se mais de 50% das fibras do músculo em regeneração, com diâmetro variável e centronucleação. Com cerca de 120 dias de idade, praticamente todas as fibras do músculo encontram-se regeneradas (TANABE; ESAKI; NOMURA, 1986).

Independentemente das diferenças observadas entre os pacientes distróficos e os camundongos *mdx*, ambos apresentam aumento da concentração de cálcio intracelular e de EROs em suas fibras musculares (BODENSTEINER; ENGEL, 1978; TURNER et al., 1991; MALLOUK; JACQUEMOND; ALLARD, 2000; ROBERT et al., 2001, JØRGENSEN et al, 2011). Sendo assim, o camundongo *mdx* constitui um bom modelo experimental para o estudo dos mecanismos envolvidos na DMD, bem como, para avaliação de potencial terapia farmacológica.

1.4 Cálcio, canais de cálcio e drogas bloqueadoras de cálcio

O íon cálcio (Ca^{2+}) é um importante elemento na constituição e função celular do organismo, envolvendo processos fisiológicos e bioquímicos essenciais para a manutenção do equilíbrio do meio interno. A concentração de Ca^{2+} intracelular é regulada pela interação de múltiplos processos de influxo e efluxo e ocorre em ondas e picos, visto que altas concentrações por longos períodos são tóxicas para as células (BOOTMAN; LIPP; BERRIDGE, 2001).

De maneira geral, as células mantêm baixas concentrações de Ca^{2+} intracelular livre, havendo alta concentração extracelular deste íon (ALBERTS et al., 2002; BOOTMAN; LIPP; BERRIDGE, 2001). O gradiente de concentração 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).

O influxo, efluxo e estocagem de Ca^{2+} intracelular são realizados 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 (FONG et al., 1990; FRANCO-OBREGON; LANSMAN, 1990; VANDEBROUCK et al., 2006). Além desses canais, outros canais também permitem a passagem de Ca^{2+} , como por exemplo, o canal ativado por alongamento (SAC, stretch activated channel) e os canais do tipo leak.

Os canais voltagem-dependentes pertencem a três famílias, de acordo com suas propriedades farmacológicas e eletrofisiológicas: canais sensíveis a dihidropiridina ativados por alta voltagem (tipo L), canais insensíveis a dihidropiridina ativados por alta voltagem (tipos P, Q, N e R) e canais ativados por baixa voltagem (tipo T) (ERTEL et al., 2000). Nos músculos estriados esqueléticos encontram-se os canais do tipo L, os quais permitem a entrada inicial do Ca^{2+} na fibra muscular e também ativam

receptores rianodina presentes no retículo sarcoplasmático promovendo a liberação de cálcio do retículo para o sarcoplasma (ROSSI; DIRKSEN, 2006).

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, JACQUEMOND; ALLARD, 2000; ROBERT et al., 2001). Experimentos com músculo cardíaco de camundongos *mdx* demonstraram que a ausência de distrofina promove alterações nos receptores dihidropiridina e no canal de cálcio tipo-L favorecendo o aumento do influxo de cálcio intracelular (WOOLF et al., 2006). Além dos canais de cálcio tipo L, os canais SAC e leak também parecem estar envolvidos com o aumento de cálcio nas fibras musculares distróficas (RANDO et al., 1998). Segundo Franco-Obregon Jr e Lansman (1990), as fibras musculares distróficas apresentam aumento na atividade desses canais antes de qualquer sinal de degeneração ou necrose muscular. Também foi observado que a ocorrência desses canais é maior em fibras musculares de *mdx* (VANDEBROUCK et al., 2002).

O aumento na concentração de Ca^{2+} intracelular resulta em proteólise dos constituintes celulares; ativação de fosfolipase A2, afetando a integridade da membrana; aumento na produção de EROs, causando peroxidação lipídica; e aumento na concentração de Ca^{2+} na mitocôndria (GISSEL, 2005 e WHITEHEAD et al. 2006).

Diante do exposto, drogas que atuam bloqueando os canais de cálcio e consequentemente inibindo o aumento citossólico de Ca^{2+} (GILMAN et al., 1991, JANIS; SILVER; TRIGGLE, 1987) pode constituir uma importante terapia farmacológica auxiliar no tratamento da DMD. O verapamil (fenilalquilamina), o diltiazem (benzotiazepina) e a nifedipina (diidropiridina) são drogas bloqueadoras de canais de cálcio que atuam sobre os canais do tipo-L e tem grande aplicabilidade para doenças do

sistema cardiovascular, como a hipertensão arterial sistêmica (OKUDA et al., 2005, JANIS; SILVER; TRIGGLE, 1987). Recentemente, verificou-se redução do Ca^{2+} total nos músculos diafragma e cardíaco em camundongos *mdx* após tratamento com verapamil e diltiazem. Ainda no mesmo trabalho, observou-se que o diltiazem atenuou a mionecrose no músculo diafragma (MATSUMURA et al., 2009).

1.4.1 Nifedipina

A nifedipina é um antagonista do cálcio do tipo 1,4-diidropiridina (Figura 2). Os antagonistas do cálcio reduzem o influxo transmembranoso de íons de cálcio para o interior da célula através do canal lento de cálcio (tipo-L). É utilizado basicamente para doenças do sistema cardiovascular, como a hipertensão arterial (ROJSTACZER; TRIGGLE, 1996).

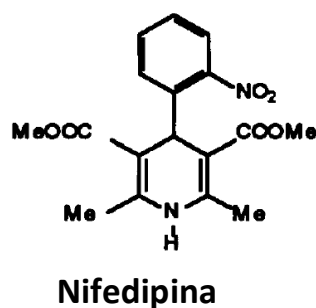


Figura 2. Estrutura química do antagonista de Ca^{++} nifedipina (ROJSTACZER; TRIGGLE, 1996)

Trabalhos relataram que a nifedipina não apresentou nenhum potencial efeito benéfico sobre a progressão da distrofia em pacientes e em animais experimentais distróficos por deficiência em sarcoglicanas (MOXLEY, 1985, MOXLEY et al., 1987, JOHNSON; BHATTACHARYA, 1993). No entanto, também foi constatado que a nifedipina não causou efeitos colaterais graves como outros

bloqueadores (MOXLEY, 1985, MOXLEY et al., 1987). Outros estudos enfocam que a nifedipina não bloqueia também os canais Leak, podendo inclusive em alguns casos aumentar a atividade desse canal (FONG et al., 1990, RIVET et al., 1992). Outros autores sugerem que não há alteração no número de canais de cálcio sensíveis a nitrendipina (derivado diidropiridínico) em pacientes distróficos, o que pode justificar a ausência de efeito do tratamento com nifedipina durante a progressão da DMD (DESNUELLE et al., 1986). Entretanto, os próprios pesquisadores relatam que o funcionamento destes canais pode estar alterado nos pacientes distróficos independente do número ser similar ao de indivíduos normais (DESNUELLE et al., 1986). Diferindo dos trabalhos apresentados anteriormente, experimentos verificaram que a nifedipina bloqueou a entrada excessiva de cálcio intracelular por canais de cálcio tipo-L em camundongos *mdx*, promovendo diminuição do aumento anormal do tônus muscular do tubo digestório nesses animais (MULÈ et al., 2001, MULÈ; SERIO, 2001). Também se observou que o influxo de cálcio no músculo extensor longo dos dedos (EDL) de camundongos *mdx* foi inibido pela aplicação de nifedipina (FRAYSSE et al., 2004). Recentemente, estudos com músculo cardíaco e com músculos estriados esqueléticos de camundongos *mdx* demonstraram que o aumento do influxo de cálcio intracelular provavelmente deve-se a alterações no canal de cálcio tipo-L provocadas pela ausência da distrofina (WOOLF et al., 2006, MATSUMURA et al., 2009).

A Nifedipina além de ser um potente bloqueador do canal de cálcio tipo-L como já descrito anteriormente, também foi relacionada à redução do estresse oxidativo em pacientes hipertensos (TADDEI et al., 2001). A administração de nifedipina ou amlodipina mostraram-se capazes de reduzir os níveis plasmáticos de malondialdeído (marcador de estresse oxidativo e oxidação de lípidos), lipoperóxidos e de Ferric-reducing anti-oxidant power (FRAP), que mensura a atividade antioxidante total, aumentando os seus níveis quando comparados aos controles, em pacientes hipertensos (GHIADONI et al., 2003).

Em outro experimento, a Nifedipina inibiu a ativação de NF- κ B em linha celular de carcinoma pulmonar humano e a ativação de TNF- α , observado pela redução da expressão da proteína luciferase estimulada pela interleucina 1 (IL-1) (MATSUMORI; NUNOKAWA; SASAYAMA, 2000) e também diminuiu os níveis séricos de proteína C-reativa (marcador inflamatório de fase aguda) de pacientes com angina estável que se submeteram a intervenção coronariana percutânea. Esse efeito anti-inflamatório pode ser explicado por aumentar a função endotelial coronariana e assim, favorecer a biodisponibilidade do óxido nítrico, que é um inibidor de moléculas pró-inflamatórias (TAKASE et al, 2005).

1.5 Espécies reativas de oxigênio (EROs)

Além dos estudos visando a compreensão dos mecanismos envolvidos no aumento do cálcio intracelular nas fibras distróficas, atualmente existe um crescente interesse no envolvimento das espécies reativas de oxigênio (EROs) na patogênese das distrofinopatias. A hipótese de que as EROs estejam envolvidas na fisiopatologia das distrofias musculares foi inicialmente baseada nas similaridades entre as mudanças patológicas que ocorrem na DMD e mudanças que ocorrem no músculo sob diferentes condições de estresse oxidativo, como isquemia, exercício físico intenso e deficiência de vitamina E (MURPHY; KEHRER, 1989; IRINTCHEV; WERNIG, 1987; MENDELL; ENGEL; DERRER, 1971). Foram observadas alterações bioquímicas no músculo distrófico que são características de lesão oxidativa (RAGUSA; CHOW; PORTER, 1997; HAYCOCK et al, 1996; HAUSER et al, 1995; MURPHY; KEHRER, 1989). O aumento do estresse oxidativo na DMD é indicado: pelo aumento da excreção de 8-hidroxy-2'-deoxyguanosine, indicativo de lesão oxidativa no DNA (RODRIGUEZ; TARNOPOLSKY, 2003); por alterações nas proteínas (NIEBRÓJ-DOBOSZ et al, 2002), indução de enzimas antioxidantes (MECHLER; IMRE; DIOSZEGHY, 1984) e acúmulo de

lipofuscina no músculo distrófico (NAKAE et al, 2004). Além disso, observou-se que as células distróficas são especificamente mais sensíveis à lesão por estresse oxidativo do que células musculares normais (RANDO et al, 1998) e que o aumento da produção das EROs, no período que antecede a qualquer necrose no camundongo *mdx*, promove peroxidação lipídica da membrana (DISATNIK et al, 1998).

Trabalhos sugerem que a produção elevada de EROs nos músculos distróficos (ver Figura 3) deve-se: (1) o acúmulo intracelular de íons cálcio conduz a uma captação anormal deste pela mitocôndria, resultando em uma produção elevada de espécies reativas de oxigênio (EROs) (BROOKES et al, 2004); (2) outra possibilidade de mecanismo de formação de EROs é através da NADPH-oxidase, a qual se tem conhecimento que produz rapidamente EROs durante o ciclo de relaxamento das células musculares lisas (GROTE et al, 2003). Recentemente, constatou-se a presença de subunidades de NADPH-oxidase no músculo estriado esquelético junto ao sarcolema (JAVESGHANI et al, 2002). Whitehead e colaboradores (2006) sugeriram que este complexo enzimático pode ser regulado pela distrofina ou por outras proteínas do CDG. Desta forma, sua função pode estar alterada nos músculos distróficos, levando a uma maior produção de EROs.

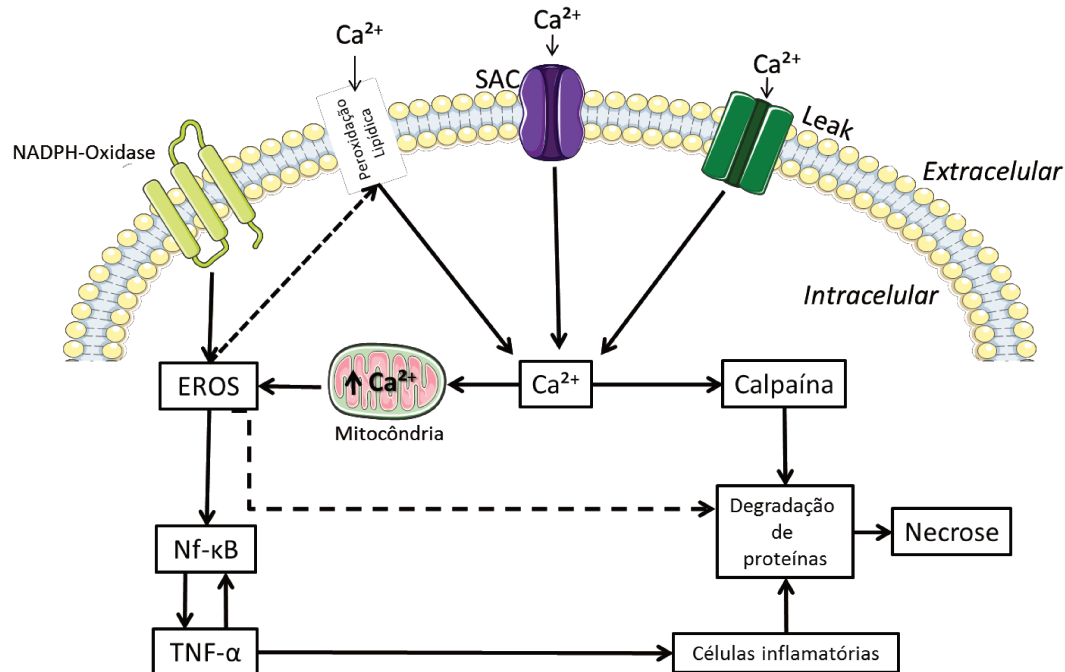


Figura 3. Diagrama esquemático demonstrando as possíveis vias de degeneração na fibra muscular distrófica, pelo aumento de EROs e de cálcio intracelular; SAC (canal de cálcio ativado por estiramento); canal de cálcio “Leak”; NF-KB (fator de transcrição nuclear); TNF- α (Fator de Necrose Tumoral alpha).

As EROs também têm sido relacionadas à ativação do fator de transcrição nuclear NF- κ B nos camundongos *mdx*, uma vez que a ativação deste fator pode ser prevenida pelo antioxidante N-acetilcisteína (KUMAR ; BORIEK, 2003). Sustentando ainda a ativação do fator NF- κ B por EROs, experimentos constataram o aumento da expressão de citocinas próinflamatórias reguladas por este fator de transcrição, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina IL-1, nos músculos de camundongos *mdx* antes do período necrótico (KUMAR; BORIEK, 2003). As evidências sugerem que as EROs podem estar envolvidas no processo distrófico, acionando uma cascata inflamatória que conduz a ativação do fator NF- κ B e subsequente liberação de mediadores inflamatórios. Segundo Messina e colaboradores 2006, a interrupção desta cascata pode ter um potencial efeito terapêutico.

1.5.1 Antioxidante Coenzima Q10

Com relação a Coenzima Q10 (CoQ10), o interesse por esta droga tem aumentado nos últimos anos, principalmente devido à sua capacidade de transferir elétrons e atuar como antioxidante (KUMAR et al., 2009). A CoQ10 é uma benzoquinona lipossolúvel endógena que funciona como um carregador de elétrons difusíveis na cadeia respiratória mitocondrial (LENAZ et al., 2007). A CoQ10 atua como um poderoso antioxidante, eliminando os radicais livres e impedindo o início e a propagação da peroxidação lipídica em biomembranas celulares (CRANE, 2001; BENTINGER; BRISMAR; DALLNER, 2007). Essa ação antioxidante também pode ocorrer por meio da ativação e aumento da expressão de proteínas mitocondriais desacopladas causando um efeito antiapoptótico (CHATURVEDI & BEAL, 2008; MARCOFF & THOMPSON, 2007). Também apresenta propriedades anti-inflamatórias diminuindo a produção de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α (SCHMELZER, et al., 2007).

Estudos recentes relataram que a CoQ10 reduziu efetivamente as EROs intracelulares induzidas pela luz UV em células epiteliais do cristalino humano (KERNT et al., 2010) e em modelo de células neuronais e estresse oxidativo (SOMAYAJULU et al., 2005), demonstrando sua capacidade antioxidante. Especificamente em relação a DMD, estudos com pacientes distróficos demonstraram que a administração de CoQ10 promoveu melhora na função cardíaca, redução dos sintomas gerados pela DMD e restauração da capacidade física (FOLKERS et al., 1985; FOLKERS; SIMONSEN, 1995). Em acordo com este trabalho, experimentos com biópsias de músculos de pacientes distróficos verificaram redução na concentração da CoQ10, sugerindo que um tratamento com reposição dessa coenzima possa apresentar potencial efeito sobre a DMD (MILES et al., 2005). Recentemente animais experimentais distróficos por deficiência em disferlina apresentaram significativa redução no processo inflamatório e

atenuação do processo de degeneração muscular após tratamento com CoQ10 (POTGIETER et al., 2011).

2. OBJETIVO

O objetivo do presente projeto foi verificar se o tratamento com o bloqueador de cálcio Nifedipina e o antioxidante Coenzima Q10, administrados isoladamente ou em associação antes que se iniciem os ciclos de degeneração/regeneração muscular, apresenta efeito benéfico sobre as fibras musculares distróficas de camundongos *mdx*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos das linhagens *mdx* e C57BL/10, camundongos heterozigotos para o gene que desencadeia a distrofia muscular de Duchenne e que deram origem à linhagem *mdx*, de ambos os sexos, com 14 dias de vida pós-natal, obtidos de casais mantidos no biotério do Departamento de Anatomia do Instituto de Biologia. As matrizes foram oriundas do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da UNICAMP. Após o nascimento, os filhotes permaneceram com a fêmea até o dia do sacrifício. Durante todo o experimento, os animais foram mantidos em caixas plásticas com 12 horas de ciclo claro/escuro, ração e água ad libitum.

Os protocolos experimentais foram desenvolvidos de acordo com os princípios éticos na experimentação animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e aprovados pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEa-IB/UNICAMP), autorizado sob o protocolo nº2961-1.

Os animais foram divididos nos seguintes grupos experimentais:

- 1) Grupo controle, constituído de camundongos da linhagem C57BL/10 (Ctrl, n=16).
- 2) Grupo *mdx*, constituído de camundongos da linhagem *mdx*.
 - a. *mdx* tratado com álcool 20% e solução aquosa 1% de Tween 80 - (*mdx*, n=20).
 - b. *mdx* tratado com nifedipina (Ni) e Coenzima Q10 (CoQ10) - (*mdx*NCo, n=20).
 - c. *mdx* tratado com Ni - (*mdx*N, n=20).
 - d. *mdx* tratado com CoQ10 - (*mdx*Co, n=20).

3.2 Drogas e Tratamento

A partir do 14º dia de vida pós-natal, os camundongos *mdx* e C57BL/10 (Ctrl) foram pesados e tratados diariamente por 14 dias com Nifedipina (Sigma, St. Louis, Mo.) e Coenzima Q10 (Galena Química e Farmacêutica Ltda, São Paulo, Brasil) e/ou com salina e solução aquosa 1% de Tween 80 de acordo com o protocolo abaixo:

- a. Grupo *mdx*NCo recebeu 10 mg/kg de Nifedipina (OKUDA et al, 2005) diluída em álcool 20% (MIQUEL et al, 2005) por gavagem e 10 mg/kg de Coenzima Q10 (FOUAD et al, 2010) diluída em solução aquosa 1% de Tween 80 por injeção intraperitoneal;
- b. Grupo *mdx*N recebeu 10 mg/kg de Nifedipina diluída em álcool 20% por gavagem;
- c. Grupo *mdx*Co recebeu 10 mg/kg de Coenzima Q10 diluída em solução aquosa 1% de Tween 80 por injeção intraperitoneal;
- d. Grupo *mdx* recebeu álcool 20% por gavagem e solução aquosa 1% de Tween 80 por injeção intraperitoneal.

3.3 Análise Histológica

Doze horas antes da eutanásia, os animais foram pesados e injetados (intraperitonealmente) 0,1 ml de uma solução a 1% de Azul de Evans (AE) para cada 10g de camundongo, (solução em PBS: 14g de fosfato de sódio monofásico, 4,3 g de fosfato de potássio dibásico anidro, 72g de cloreto de sódio em um litro de água destilada; pH 7,5), conforme descrito por Hamer et al (2002) e Matsuda et al (1995). Após o tempo acima referido, os animais (n=03 grupo Ctrl; n=05 grupos *mdx*) foram anestesiados por via intra-peritoneal com solução de cloridrato de xilazina 2% (Vyrbaxyl, Virbac) e

cloridrato de quetamina (Francotar, Virbac) na proporção de 1:1 e dose de 0,1mL/30g de peso corporal. Os músculos STN, DIA e TA foram retirados, congelados em isopentano a -90°C , resfriado a -159°C em nitrogênio líquido e armazenados em biofreezer a -70°C . Para obtenção dos cortes em criostato (Microm-HS) os músculos foram mantidos a -23°C , seccionados transversalmente na espessura de 8 μm e coletados em lâmina. Foram obtidas 06 lâminas com 12 cortes dos músculos STN, DIA e TA dos referidos grupos experimentais. Dessas, 03 foram banhadas com acetona por 15 minutos e posteriormente montadas em meio de montagem DABCO (Sigma) para fluorescência para visualização das fibras coradas com AE e 03 foram coradas com HE e montadas em resina. Também foram delimitadas as áreas de inflamação (%INFL.) e área total do músculo. Para delimitar essas áreas, as imagens foram capturadas por uma câmera fotográfica (Nikon Express Series) acoplada ao microscópio (Nikon®, Eclipse TS100/TS100F) e analisadas pelo programa NIS-elements AR Advances Reserches.

Para a verificação da penetração do AE nas fibras musculares, analisamos dois cortes de cada músculo em microscópio óptico de fluorescência (Nikon®, Eclipse TS100/TS100F). O número de fibras coradas foi quantificado e expresso em porcentagem em relação ao número total de fibras da mesma secção.

As lâminas coradas com HE foram observadas em microscópio de luz. Avaliamos o número de fibras que apresentarem núcleo central (indicativo de fibras musculares regeneradas – TORRES; DUCHEN, 1987) e de fibras com núcleo periférico (característica de fibras normais). A contagem da população de fibras foi obtida através de um retículo de cem pontos acoplado à ocular do microscópio em objetiva de 40X, com auxílio de um contador manual. Todas as fibras dos cortes (fibras normais e regeneradas) foram contadas para estimar a população total de fibras de cada músculo, possibilitando a obtenção da porcentagem de fibras normais e regeneradas dos animais empregados no experimento.

3.4 Determinação da Atividade de Creatina-Quinase (CK)

A atividade de CK foi determinada no soro dos animais de todos os grupos. Após anestesia (protocolo descrito no item 3.4), amostras de sangue foram coletadas por punção cardíaca e centrifugadas (centrifuga refrigerada Sigma® 3-18K) a 3000 rpm, por 10 minutos a 4°C. O soro obtido foi utilizado para determinar a atividade de CK através do kit CK Nac Cinético Crystal da Bioclin. As absorbâncias das amostras foram lidas a 25°C utilizando-se espectrofotômetro U.V. (Thermo Electron Corporation® Spectrophotometer Genesys 20) com comprimento de onda de 340 nm e cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico. Os valores foram expressos em U/L.

3.5 Quantificação de TNF- α , NF- κ B e 4-HNE

Após retirada do sangue, os animais foram perfundidos com PBS e os músculos STN, DIA e TA removidos e cortados em pequenos pedaços, homogeneizados imediatamente em 2 ml de tampão para homogeneização (Triton X-100 1%, tris-HCl 100mM (ph 7,4), pirofosfato de sódio 100mM, fluoreto de sódio 100mM, EDTA 10mM, ortovanadato de sódio 10 mM, PMSF 2 mM e 0,1mg/ml de aprotinina) a 4°C usando homogeneizador tipo Polytron PTA 20S (modelo PT 10/35; Kinematica Ag) operado em velocidade máxima por 30 segundos. Os extratos foram centrifugados a 11000 rpm a 4°C por 20 minutos e o sobrenadante foi utilizado para análise do extrato total. A determinação de proteína foi realizada pelo método de BRADFORD (BOOTMAN et al, 1976). As amostras do extrato protéico foram tratadas com tampão Laemmli (azul de bromofenol 0,1% e fosfato de sódio 1 M pH 7,0, glicerol 50% e SDS 10%), acrescido de ditiotretiol 100mM, aquecidas em água fervente por 5 minutos e centrifugadas por 1 minuto. Em seguida, 30 μ g de proteína foram aplicados em gel SDS-poliacrilamida a 12% em aparelho para eletroforese da Bio-Rad (mini-Protean, Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, EUA). A eletrotransferência do gel para a membrana de nitrocelulose foi realizada em 90 minutos a

120V (constante) em aparelho de transferência da Bio-Rad. A seguir, as membranas foram coradas com solução de Ponceau (FOGAGNOLO MAURICIO et al, 2012). Posteriormente, as membranas foram lavadas e incubadas com solução basal (Trisma base 10mM, cloreto de sódio 150mM e Tween-20 0,02%) contendo 5% de leite desnatado, por 2 horas em temperatura ambiente para reduzir a ligação não específica de proteínas. Posteriormente, incubadas com 10µg de anticorpo primário: anticorpo policlonal anti-rabbit TNF- α , (Chemicon); e/ou anticorpo monoclonal anti-rabbit NF- κ B, (p65 phospho S276, Abcam, Cambridge); e/ou anticorpo policlonal anti-rabbit 4HNE, (Santa Cruz Biotechnology) diluído em 10ml de solução basal contendo 3% de leite desnatado a 4°C durante a noite. No dia seguinte, as membranas foram lavadas por 30 minutos com solução basal e incubadas em 10ml de solução basal contendo 1% de leite desnatado e 2,5µg de anticorpo secundário (anti-mouse IgG Peroxidase; e/ou anti-rabbit IgG Peroxidase; e/ou anti-mouse IgG Peroxidase) por duas horas 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, N.Y, USA). As densidades das bandas e das amostras sobre o filme foram escaneadas e “salvas” em discos de computador para quantificação da densitometria ótica, usando um scanner e o programa ImageJ (Image Processing and Analysis in Java).

3.6 Determinação de cálcio total nos músculos

Os músculos STN, TA e DIA 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.

3.7 Análise Estatística

Para análise estatística foi utilizado o teste ANOVA One Way seguido do teste Bonferroni para as devidas comparações entre os grupos, e os dados foram apresentados por meio de média e desvio padrão. Foram assumidos grau de significância de 5%. As análises foram processadas por meio do software GradPad Prism 5.

4. RESULTADOS

4.1 Peso corporal

O peso corpóreo dos animais não diferiu significativamente entre os animais dos grupos experimentais Ctrl, *mdx*, *mdxNCo*, *mdxN* e *mdxCo* (média do peso corpóreo no 28º dia de vida: CtrlS $8,3 \pm 0,6$; *mdxS* $8,6 \pm 1,1$; *mdxND* $7,8 \pm 0,4$; *mdxN* $8,7 \pm 0,7$ e *mdxD* $8,7 \pm 0,3$; $p > 0.05$, ANOVA).

4.2 Análise de creatino-quinase (CK) no plasma sanguíneo

No presente trabalho (ver Figura 4), observou-se aumento significativo nos níveis séricos de CK nos camundongos *mdx* em relação aos animais controle (grupo *mdx*: $1395,03 \pm 232,27$ U/L; grupo Ctrl: $273,07 \pm 56,03$ U/L; $p > 0.05$, ANOVA). Os animais *mdx* dos grupos *mdxNCo* e *mdxCo* apresentaram redução significativa nos níveis de CK quando comparados ao grupo *mdx* (grupo *mdxNCo*: $422,01 \pm 312,63$ U/L; grupo *mdxCo*: $249,33 \pm 154,60$ U/L; grupo *mdx*: $1395,03 \pm 232,27$ U/L; $p > 0.05$, ANOVA). O grupo *mdxN* apresentou níveis de CK semelhante ao grupo *mdx* (grupo *mdxN*: $1361,58 \pm 189,62$ U/L; grupo *mdx*: $1395,03 \pm 232,27$ U/L; $p > 0.05$, ANOVA).

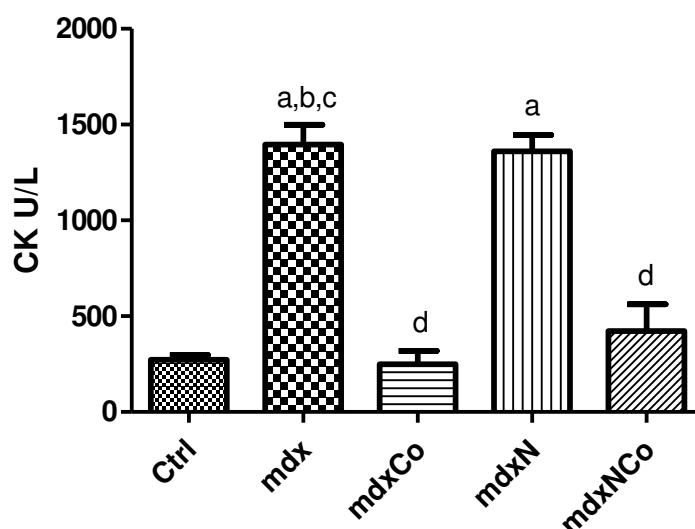


Figura 4. Média dos níveis de CK total no plasma sanguíneo expressos em U/L. Valores são expressos como média e desvio padrão (U/L; n= 05 animais por grupo). Grupo Ctrl: camundongo C57BL/10; grupo *mdx*: camundongo *mdx* sem tratamento; grupo *mdxNCo*: camundongo *mdx* tratado com Nifedipina e Coenzima Q10; grupo *mdxN*: camundongo *mdx* tratado com Nifedipina; grupo *mdxCo*: camundongo *mdx* tratado com Coenzima Q10. a: difere do grupo Ctrl; b: difere do grupo *mdxNCo*; c: difere do grupo *mdxCo*; d: difere do grupo *mdxN*. $p < 0,05$; ANOVA "one-way", seguida de comparação múltipla do teste de Bonferroni.

4.2 Análise morfológica qualitativa e quantitativa

Os músculos STN, TA e DIA dos grupos Ctrl, *mdx*, *mdxNCo*, *mdxN* e *mdxCo* apresentaram fibras musculares com diferentes características histológicas. Foram observadas fibras em processo de degeneração, fibras com núcleo periférico e fibras regeneradas.

A Figura 5 demonstra as características histológicas analisadas. As fibras com núcleo periférico apresentaram formato poligonal em justaposição com outras fibras de mesma característica (Figura

5A). Fibras regeneradas foram caracterizadas pelo núcleo centralizado, cromatina condensada, citoplasma eosinófilo e diâmetro próximo ao de uma fibra muscular esquelética com núcleo periférico (Figura 5A). As áreas de inflamação/regeneração (Figura 5B) foram caracterizadas pela presença de fibras em estado inicial de regeneração, caracterizadas por pequenos miócitos fortemente basófilos com núcleo central entremeado por infiltrado inflamatório exuberante, em áreas de grande celularidade. As fibras com alteração de permeabilidade ou em degeneração foram evidenciadas pela presença de azul de Evans no seu interior (Figura 5D).

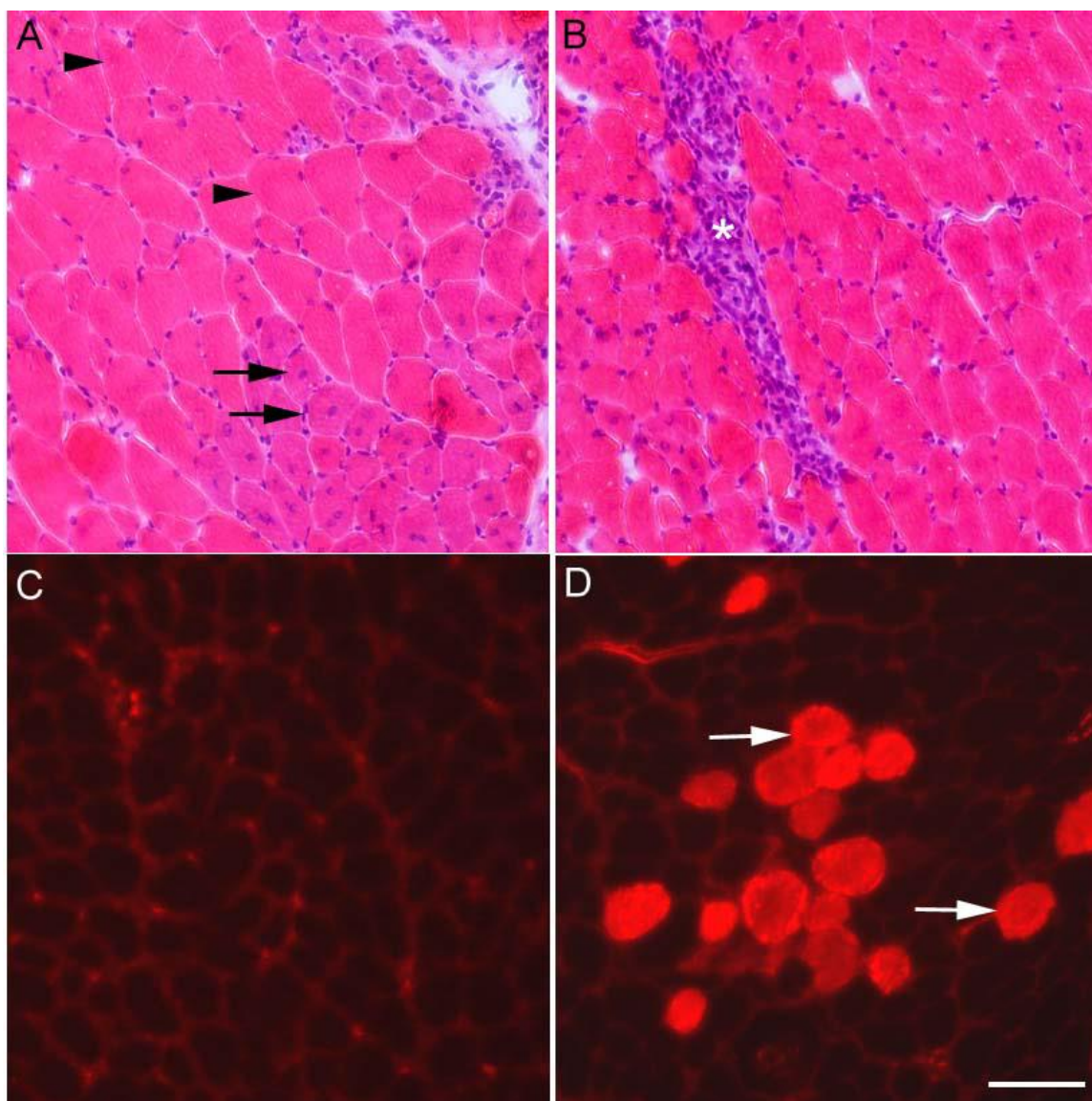


Figura 5. Secção transversal dos músculos STN (A,B) e TA (C,D) dos grupos *mdx* (A,B), Ctrl (C) e *mdxNCo* (D). Em A, observa-se fibras com núcleo periférico (cabeça de setas) e fibras com núcleos centrais (setas pretas). Em B, área de inflamação e regeneração (asterisco). Em C, fibras do grupo CTRL não positivas ao AE. Em D, fibras positivas ao AE (setas brancas). Coloração HE. Barra de escala: 50µM.

Para análise quantitativa dos grupos experimentais foram utilizadas as seguintes variáveis: porcentagem de fibras positivas ao azul de Evans ou em degeneração (%AE), porcentagem de fibras

com núcleo central (%NC) e porcentagem de fibras com núcleo periférico (%NP) em relação ao número total de fibras musculares. Também foi avaliada a porcentagem de área de inflamação (%INFL.) em relação a área total do músculo.

Comparando-se os músculos TA, STN e DIA observamos uma diferença entre eles (ver Tabela 1) quanto a porcentagem de fibras com núcleo periférico (indicativo de fibras que não passaram pelo processo de mionecrose), de fibras positivas ao AE (que indica perda da integridade do sarcolema e mionecrose) e de fibras regeneradas (núcleo central).

Em nossos experimentos observamos aumento significativo da mionecrose (maior porcentagem de fibras positivas ao AE) nos músculos TA e STN do grupo *mdx* em relação ao grupo Ctrl e redução significativa deste aumento no músculo TA dos animais do grupo *mdxN*. Os demais grupos experimentais dos músculos TA e STN também apresentaram diminuição de fibras positivas ao AE, porém esta redução não foi significativa. O músculo DIA do grupo *mdx* apresentou aumento na expressão de fibras positivas ao AE quando comparado ao grupo controle, porém, provavelmente devido ao elevado desvio padrão, este não foi significativo.

Após tratamento com a associação de Nifedipina e Coenzima Q10 e/ou a Coenzima isoladamente, observamos significativa redução de áreas com infiltrado inflamatório no músculo DIA.

Tabela 1. Porcentagem de fibras com núcleo central, com núcleo periférico, positivas ao azul de Evans e áreas de inflamação nos músculos tibial anterior (TA), esternomastóideo (STN) e diafragma (DIA).

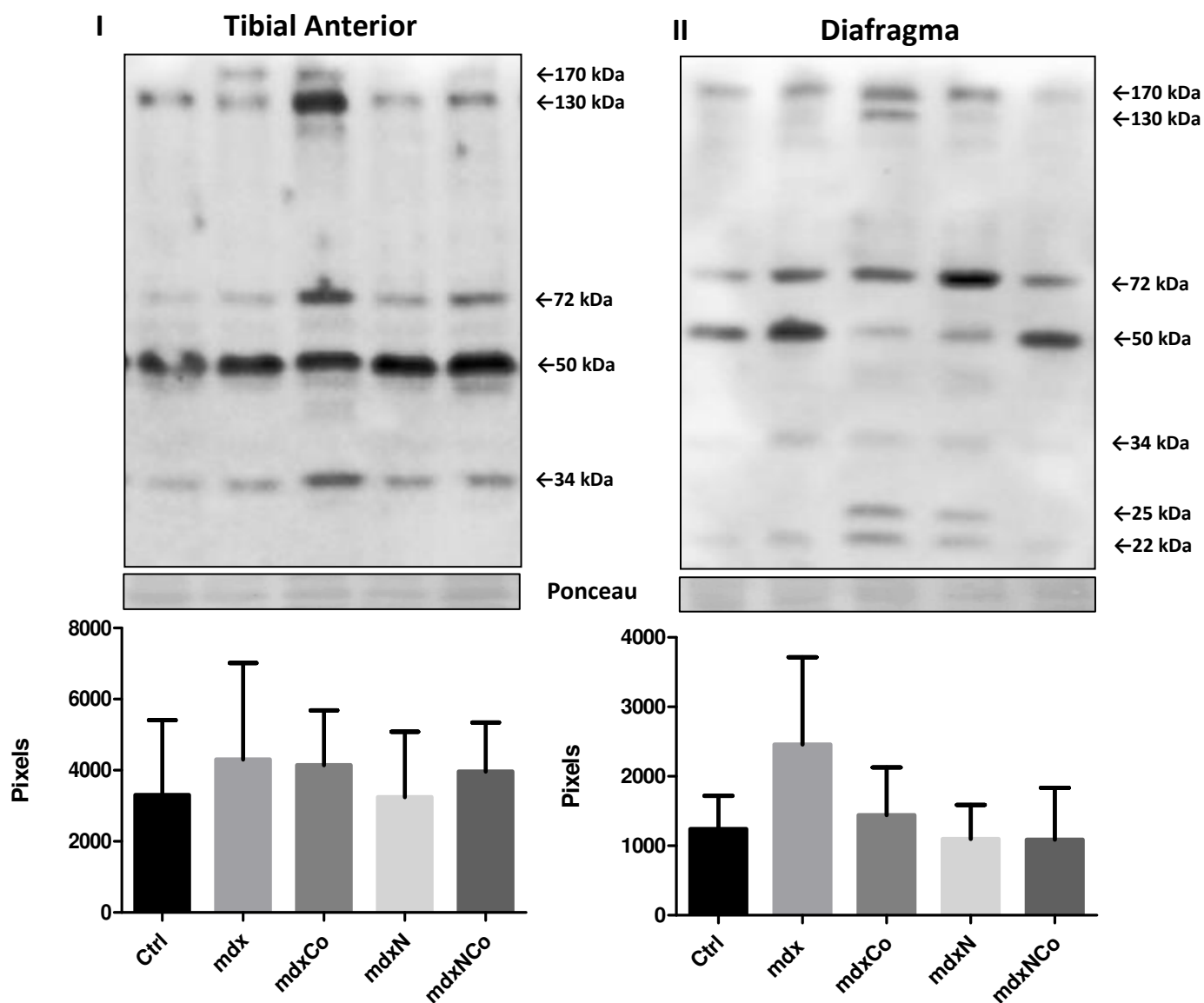
		%NC	%NP	%AE	% Infl.
TA	Ctrl	0,0	99,8	0,0	0,0
	<i>mdx</i>	28,6 ^a	65,7 ^a	5,7 ^a	8,1 ^a
	<i>mdxCo</i>	22,3	74,7	3,6	0,9
	<i>mdxN</i>	30,9 ^a	68,5 ^a	0,5 ^b	4,1
	<i>mdxNCo</i>	11,9	84,8	3,3	11,5
STN	Ctrl	0,0	99,6	0,0	0,0
	<i>mdx</i>	29,2 ^a	62,8 ^a	7,9 ^a	13,0 ^a
	<i>mdxCo</i>	34,9 ^a	59,1 ^a	5,8	4,8
	<i>mdxN</i>	18,9	78,5	0,4	2,3
	<i>mdxNCo</i>	39,5 ^a	55,9 ^a	4,5	1,4
DIA	Ctrl	0,0	99,6	0,0	0,0
	<i>mdx</i>	4,7 ^a	89,7 ^a	0,8	4,0 ^a
	<i>mdxCo</i>	3,0	96,3	0,7	1,2 ^b
	<i>mdxN</i>	3,2	94,3	0,9	2,4 ^a
	<i>mdxNCo</i>	6,1	91,2	0,7	1,6 ^b

%NC, porcentagem de fibras regeneradas com núcleo central; %NP, porcentagem de fibras com núcleo periférico; %AE, porcentagem de fibras positivas ao azul de Evans; % Infl., porcentagem de área de inflamação. Grupo Ctrl: camundongo C57BL/10; grupo *mdx*: camundongo *mdx* sem tratamento; grupo *mdxNCo*: camundongo *mdx* tratado com Nifedipina e Coenzima Q10; grupo *mdxN*: camundongo *mdx* tratado com Nifedipina; grupo *mdxCo*: camundongo *mdx* tratado com Coenzima Q10. **a.** Difere do grupo Ctrl; **b.** Difere do grupo *mdx*; $p < 0,05$; ANOVA "one-way", seguida de comparação múltipla do teste de Bonferroni.

4.3 Análise do Western Blotting

4.3.1 4-HNE

A quantificação do imunoblotting para 4-HNE não apresentou diferença estatisticamente significativa nos músculos TA, DIA e STN entre os grupos avaliados (Figuras 6I, 6II e 6III).



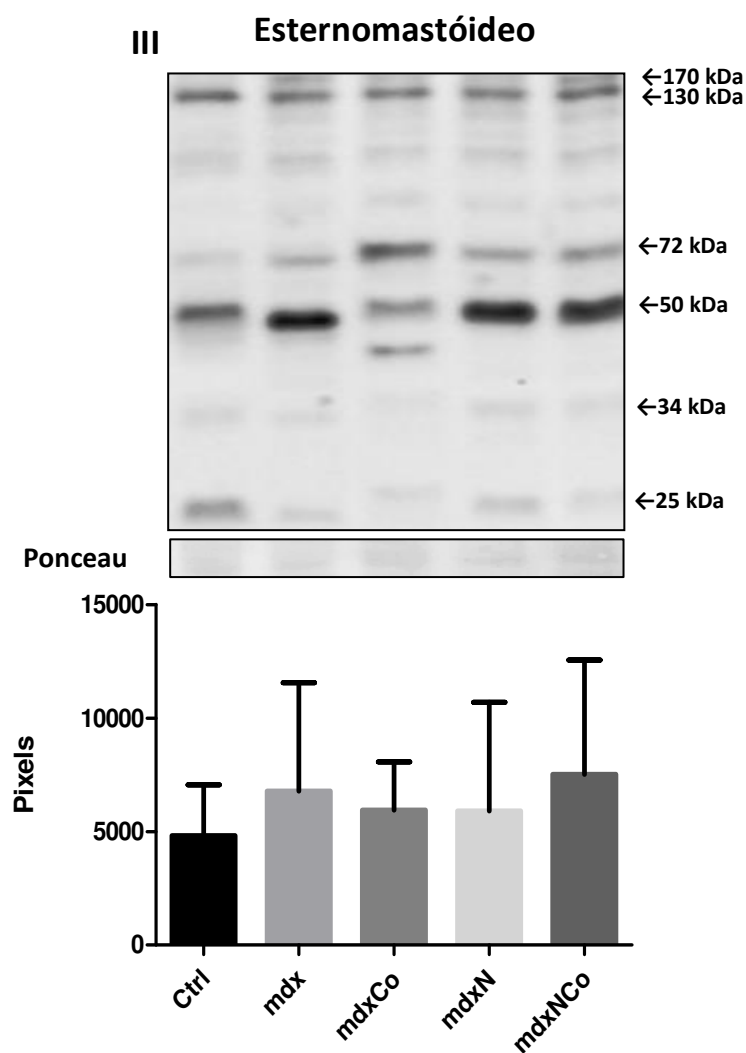
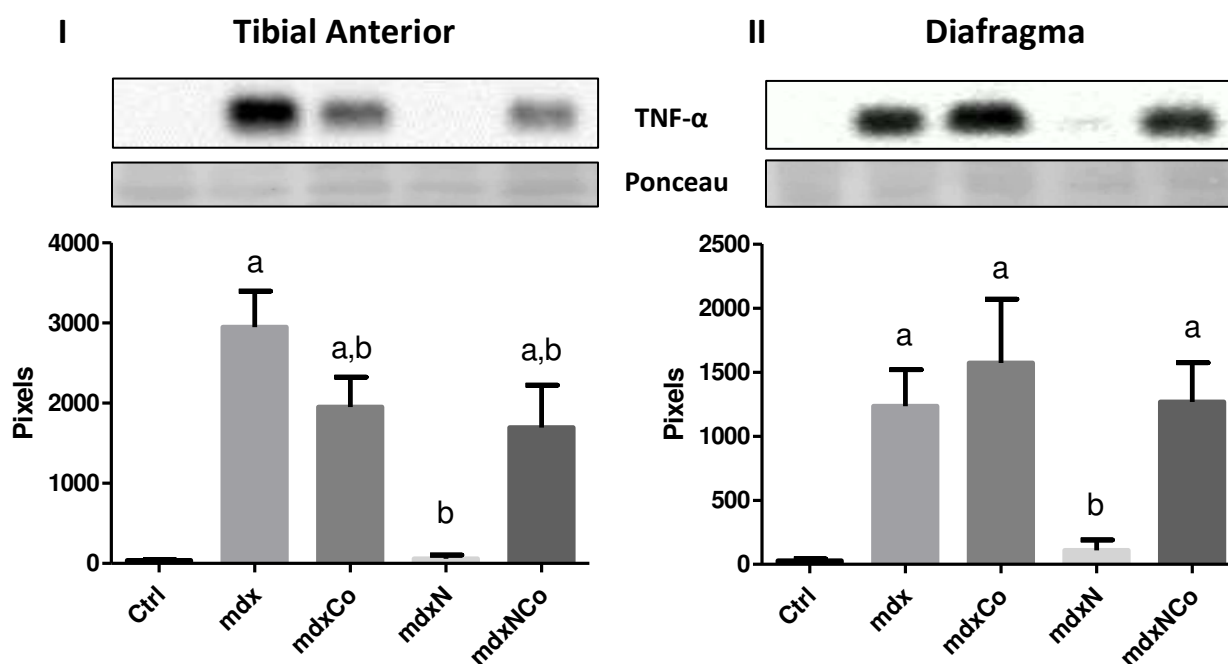


Figura 6. Grupo Ctrl: camundongo C57BL/10; grupo *mdx*: camundongo *mdx* sem tratamento; grupo *mdxNCo*: camundongo *mdx* tratado com Nifedipina e Coenzima Q10; grupo *mdxN*: camundongo *mdx* tratado com Nifedipina; grupo *mdxCo*: camundongo *mdx* tratado com Coenzima Q10. I. músculo tibial anterior e respectivo gráfico de quantificação; II. músculo diafragma e respectivo gráfico de quantificação; III. músculo esternomastóideo e respectivo gráfico de quantificação. ANOVA "one-way", seguida de comparação múltipla do teste de Bonferroni.

4.3.2 TNF- α

A análise da proteína TNF- α (figuras 7I, 7II e 7III) mostraram aumento nos grupos *mdx* quando comparados ao grupo CTRL em todos os músculos (TA, DIA e STN). Além disso, o músculo TA apresentou redução significativa nos grupos *mdxCO*, *mdxN* e *mdxNCo*, sendo que o grupo tratado com Nifedipina não apresentou redução significativa comparados ao grupo controle. Os músculos DIA e STN também apresentaram redução significativa no grupo tratado com Nifedipina (*mdxN*).



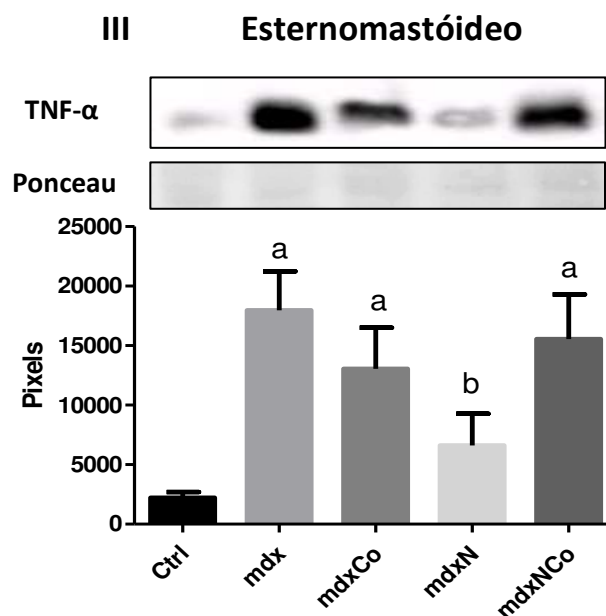


Figura 7. Grupo Ctrl: camundongo C57BL/10; grupo *mdx*: camundongo *mdx* sem tratamento; grupo *mdxNCo*: camundongo *mdx* tratado com Nifedipina e Coenzima Q10; grupo *mdxN*: camundongo *mdx* tratado com Nifedipina; grupo *mdxCo*: camundongo *mdx* tratado com Coenzima Q10. I. músculo tibial anterior e respectivo gráfico de quantificação; II. músculo diafragma e respectivo gráfico de quantificação; III. músculo esternomastóideo e respectivo gráfico de quantificação. a. Difere do grupo Ctrl; b. Difere do grupo *mdx*; $p < 0,05$; ANOVA "one-way", seguida de comparação múltipla do teste de Bonferroni.

4.3.3 NF-kB

Os músculos DIA e STN exibiram diminuição significativa entre o grupo não tratado (*mdx*) e os seus respectivos controles (CTRL). O músculo diafragma teve reduções significativas em todos os grupos tratados comparados tanto ao grupo controle quanto ao *mdx* não tratado. No músculo

esternomastóideo, o único grupo com redução estatística foi o tratado com Coenzima Q10, enquanto os outros apresentam aumento na quantidade de proteína (figura 8I, 8II e 8III)

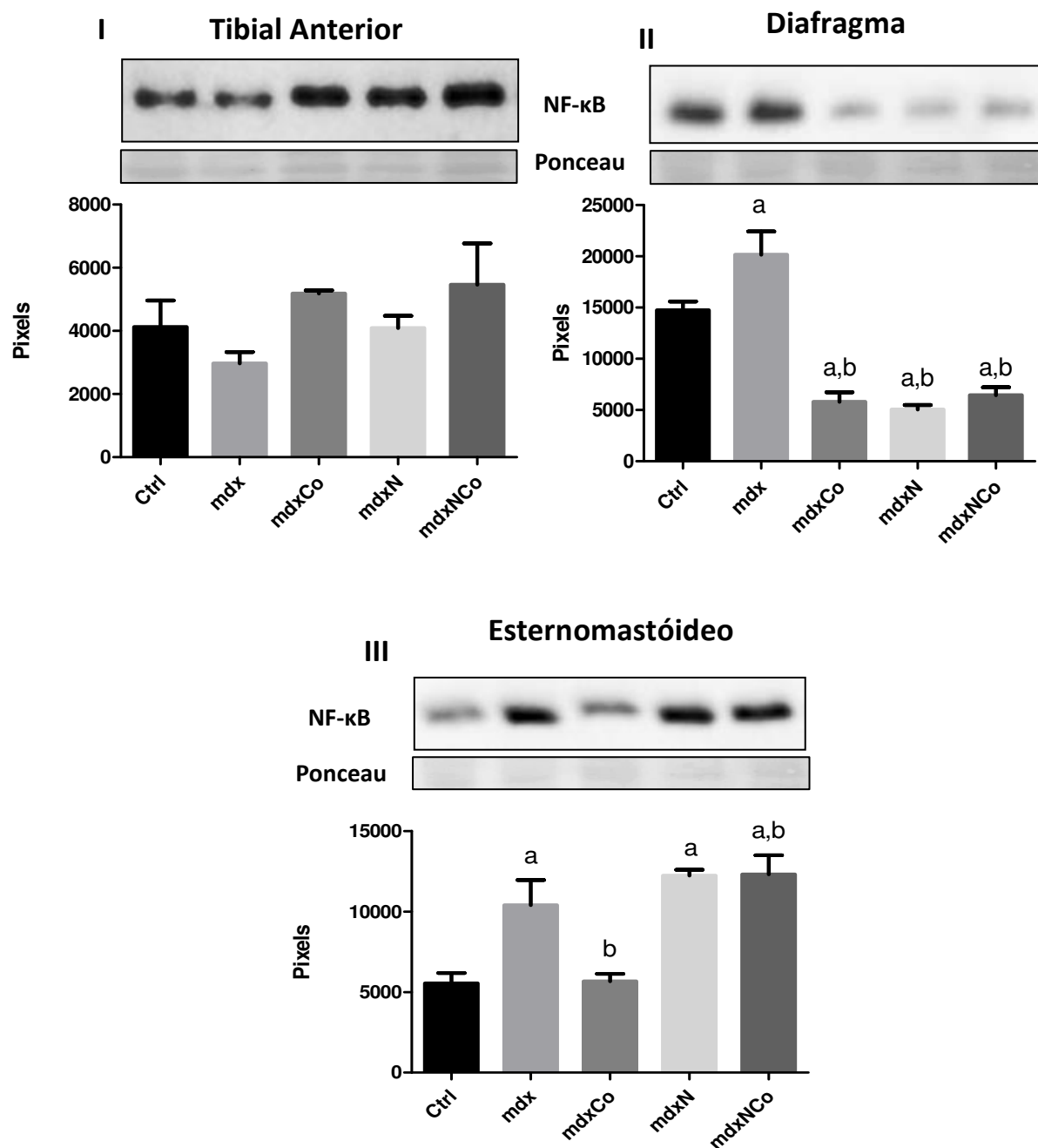


Figura 8. Grupo Ctrl: camundongo C57BL/10; grupo *mdx*: camundongo *mdx* sem tratamento; grupo *mdxNCo*: camundongo *mdx* tratado com Nifedipina e Coenzima Q10; grupo *mdxN*: camundongo *mdx*

tratado com Nifedipina; grupo *mdxCo*: camundongo *mdx* tratado com Coenzima Q10. I. músculo tibial anterior e respectivo gráfico de quantificação; II. músculo diafragma e respectivo gráfico de quantificação; III. músculo esternomastóideo e respectivo gráfico de quantificação. a. Difere do grupo Ctrl; b. Difere do grupo *mdx*; $p < 0,05$; ANOVA "one-way", seguida de comparação múltipla do teste de Bonferroni.

4.3 Determinação de cálcio total nos músculos

Para observar a ação da Nifedipina e da Coenzima Q10 na quantidade de cálcio total das fibras musculares realizamos a dosagem deste íon e os resultados são observados na figura 9.

Houve aumento significativo ($p < 0,05$; ANOVA) de cálcio total no grupo *mdx* quando comparado ao grupo controle nos músculos DIA e STN. O músculo TA do grupo *mdx* também apresentou aumento, porém este não foi significativo.

O músculo DIA apresentou diminuição significativa ($p < 0,05$; ANOVA) de cálcio total nos grupos Nifedipina+Coenzima Q10, Nifedipina e/ou Coenzima Q10, quando comparado ao *mdx*. O músculo STN também apresentou redução do cálcio após os 3 tratamentos em relação aos animais não tratados, porém a redução só foi significativa no grupo *mdxCo*. Não houve diferença significativa no músculo TA nos grupos *mdxNCo*, *mdxN* e *mdxCo* quando comparados ao grupo *mdx*.

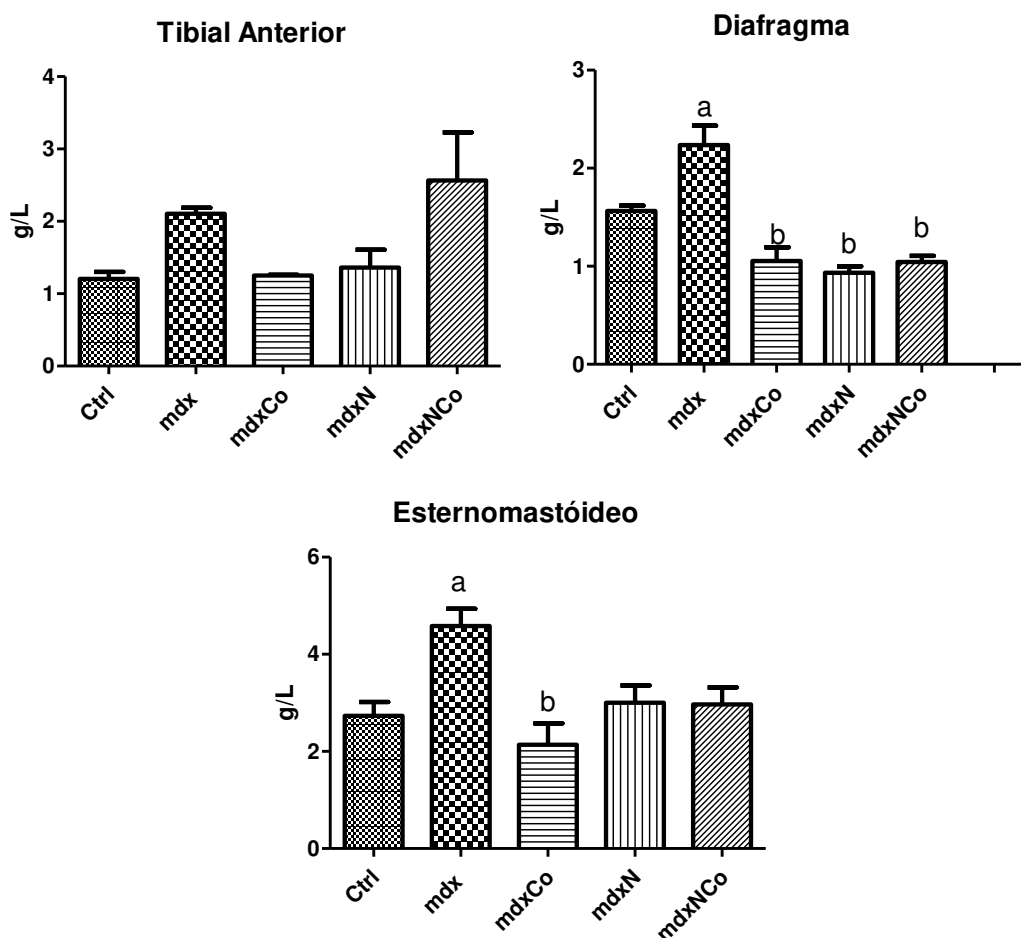


Figura 9. Média dos níveis de cálcio total nos músculos tibial anterior, diafragma e esternomastóideo expressos em g/L. Valores são expressos como média e desvio padrão (g/L; n= 05 animais por grupo). Grupo Ctrl: camundongo C57BL/10; grupo *mdx*: camundongo *mdx* sem tratamento; grupo *mdx*NCo: camundongo *mdx* tratado com Nifedipina e Coenzima Q10; grupo *mdx*N: camundongo *mdx* tratado com Nifedipina; grupo *mdx*Co: camundongo *mdx* tratado com Coenzima Q10. **a:** difere do grupo Ctrl; **b:** difere do grupo *mdx*. $p < 0,05$; ANOVA "one-way", seguida de comparação múltipla do teste de Bonferroni.

5. DISCUSSÃO

No presente trabalho, avaliamos o efeito do antioxidante Coenzima Q10 e do bloqueador de cálcio Nifedipina, administrados isoladamente ou em conjunto, sobre fibras musculares distróficas. No intuito de obter uma visão mais ampla dos efeitos desses medicamentos sobre diferentes músculos distróficos do camundongo *mdx*, vários parâmetros foram avaliados.

5.1 Efeitos Colaterais

O primeiro parâmetro avaliado em nossos experimentos foi o peso corporal dos animais ao final do tratamento. Verificamos que o tratamento isolado de CoQ10, Nifedipina ou a associação dos dois medicamentos, em nossas condições experimentais e na dosagem proposta, não interfere com a taxa de crescimento dos camundongos *mdx*. Este resultado está de acordo com outros trabalhos que também não observaram efeitos deletérios da administração de CoQ10 ou Nifedipina em experimentos *in vivo* ou *in vitro* (OVERVAD et al, 1999; BHAGAVAN; CHOPRA, 2006; BRUNTON; LAZO; PARKER, 2006).

A CoQ10 é encontrada em todas as células do corpo humano, e as maiores concentrações são observadas nos tecidos do cérebro, coração, fígado e músculo esquelético (SPINDLER; BEAL; HENCHCLIFFE, 2009). É uma provitamina lipossolúvel sintetizada endogenamente, que possui a capacidade de proteger fosfolipídeos, proteínas da membrana mitocondrial e o DNA dos danos oxidativos (TOMASETTI et al, 1999), além de apresentar a capacidade de regenerar outros antioxidantes como ácido ascórbico e o α -tocoferol (KIM; PARK, 2010). Devido as suas propriedades terapêuticas e ao fato que sua deficiência nos tecidos está associada a alterações degenerativas e

envelhecimento, a suplementação diária com CoQ10 tem sido muito utilizada no tratamento de doenças em vários países (HIDAKA et al., 2008). Quanto a administração exógena de CoQ10, estudos indicam que esta apresenta baixa toxicidade e não induz sérios efeitos adversos no ser humano (HATHCOCK; SHAO, 2006); e não tem influência sobre a biossíntese endógena de CoQ10, ou acúmulo no plasma e tecidos após o término da suplementação (HIDAKA et al., 2008).

Com relação à Nifedipina, esta constitui um fármaco da classe dos inibidores dos canais de cálcio utilizado na clínica no tratamento da hipertensão arterial e angina (BRUNTON, LAZO; PARKER, 2006). Normalmente, o tratamento em pacientes é iniciado com doses a partir de 10 mg/dia, podendo chegar a doses de até 60 mg/dia (RAHEEM et al, 2012). Em adição, colaborando com nossos resultados, poucos efeitos colaterais têm se atribuído a administração de Nifedipina (MOXLEY, 1985, MOXLEY et al., 1987; BRUNTON; LAZO; PARKER, 2006).

5.2 Degeneração/Regeneração muscular

Há duas abordagens principais usadas para medir a extensão de fibras em degeneração (para revisão ver GROUNDS et al., 2008). A primeira usa marcadores (como corantes ou proteínas) que rapidamente entram na fibra muscular através do sarcolema danificado e permanecem no sarcoplasma (como por exemplo, o azul de Evans). A segunda abordagem verifica o nível de proteínas, em amostras sanguíneas (soro ou plasma), que saem de fibras musculares lesadas e se difundem para a corrente sanguínea (como por exemplo, a enzima creatina quinase - CK).

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 possibilita detectar alterações de permeabilidade do sarcolema e fibras em degeneração precocemente, fornecendo informações sobre algumas características dinâmicas e estruturais de músculos esqueléticos normais e portadores de patologias (MARQUES et al., 2008; MATSUDA et al., 1995).

Nossos dados demonstram que os músculos TA, STN e DIA distróficos apresentam fibras positivas ao AE. No entanto, a porcentagem dessas fibras difere entre os três músculos estudados. Os músculos TA e STN, no período analisado, apresentam maior número de fibras em degeneração do que o músculo DIA. Colaborando com nossos resultados, dados similares foram observados em camundongos *mdx* com aproximadamente 30 dias de vida (MARQUES et al., 2009); alto nível de necrose muscular foi observado no músculo TA de camundongos distróficos entre 21 e 28 dias de idade (SHAVLAKADZE et al., 2004) e o pico de degeneração do músculo DIA foi descrito como sendo em torno de 36 dias pós-natal (MATSUMURA et al., 2009). Avaliando os tratamentos utilizados no presente estudo, verificamos redução significativa de fibras positivas ao AE no músculo TA do grupo *mdxN* em relação ao grupo *mdx*. Os demais tratamentos também apresentaram redução de fibras positivas ao AE nos músculos TA e STN, porém não significativa.

Uma observação importante do presente trabalho diz respeito à diferença das respostas dos músculos estudados. Existem relatos na literatura que mostram diferenças na evolução e intensidade das lesões musculares de acordo com a função desempenhada pelo músculo tais como locomoção, manutenção postural e respiração (PASTORET; SEBILLE, 1995) e que alguns grupos musculares não sofrem degeneração, tais como os músculos extra-oculares (MARQUES et al., 2007a) e os músculos intrínsecos da laringe (MARQUES et al., 2007b). Existe ainda a hipótese de que as diferenças entre as proporções dos tipos de fibras musculares existentes em cada músculo podem ser responsáveis pelas características biomecânicas que proporcionam diferentes resistências às lesões decorrentes da

distrofinopatia (HASLETT et al., 2005; BANI et al., 2008). Possivelmente, a diferença observada na degeneração e mionecrose nos músculos estudados é consequência dos diferentes momentos em que cada músculo apresenta os ciclos de degeneração/regeneração (PASTORET; SEBILLE, 1995; MARQUES et al., 2008) e das diferentes respostas dos músculos aos fármacos utilizados, assim como relatado em estudos anteriores (RADLEY, GROUNDS, 2006; MARQUES et al., 2008).

Com relação à análise de CK, especificamente na DMD, os níveis séricos sistêmicos desta enzima podem ser de 50 a 100 vezes acima dos limites máximos superiores dos valores de referência (ENGEL; YAMAMOTO; FISCHBECK, 1994) e nos camundongos da linhagem *mdx*, esses valores também estão elevados durante toda a vida do animal (YOSHIDA et al, 2006).

A 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. 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.

Nossos resultados, quanto a determinação da CK nos animais distróficos, estão de acordo com a literatura (TONON et al., 2012; DE SENZI MORAES PINTO et al., 2013; FOGAGNOLO MAURICIO et al, 2012), demonstrando que esses apresentam valores significativamente maiores

(cerca de 5 vezes) em relação ao grupo controle. Diferindo da análise de azul de Evans, o grupo tratado com Nifedipina não apresentou redução nos níveis séricos de CK. Cabe ressaltar que, os níveis plasmáticos da CK refletem a quantidade de CK liberada por todos os músculos estriados esqueléticos e pela musculatura estriada cardíaca. Desta forma, o resultado da análise histológica isolada de cada músculo pode não coincidir com os valores da CK, pois, como já mencionado anteriormente, os ciclos de degeneração/regeneração podem variar de um músculo para outro (PASTORET; SEBILLE, 1995; RADLEY; GROUNDS, 2006).

Para análise da regeneração muscular, avaliamos o número de fibras que apresentavam núcleo centralizado, o qual é considerado um indicador de regeneração após a degeneração (McGEACHIE et al., 1993). Em nossas condições experimentais, nenhum dos tratamentos propostos apresentou redução significativa no número de fibras regeneradas. Este é um dado interessante, pois sugere que as drogas utilizadas apresentaram potencial efeito sobre fibras que ainda não haviam sofrido degeneração muscular, demonstrando que estas atuam como drogas de prevenção. Este resultado está de acordo com outros trabalhos que também demonstraram o efeito preventivo dos medicamentos utilizados, preferencialmente com relação a CoQ10 (CONKLIN, 2005; YONEDA et al., 2013; HOHENHAUS et al., 1994). No que diz respeito à Nifedipina, estudos revelaram sua atuação preventiva em edema pulmonar provocado por alta altitude (HOHENHAUS et al., 1994).

5.3 Resposta Inflamatória

A resposta inflamatória do tecido muscular se inicia previamente à morte das fibras musculares. Ela compreende uma série de eventos que envolvem a integração do sistema imunológico com o tecido lesado e sua finalidade é o reparo tecidual, para que a regeneração possa acontecer (PRISK; HUARD,

2003). As fibras musculares em degeneração liberam várias substâncias, dentre as quais se destacam as citocinas pró-inflamatórias, proteases, prostaglandinas, collagenases, fatores quimiotáticos e fatores de crescimento. As citocinas pró-inflamatórias e os fatores quimiotáticos estimulam o deslocamento de células inflamatórias, principalmente neutrófilos e macrófagos, para local da lesão (TIDBALL; WEHLING-HENRICKS, 2005). Os neutrófilos e macrófagos liberam proteases que degradam os fragmentos celulares e fagocitam estes fragmentos, auxiliando na remoção dos mesmos do local da lesão. As proteases liberadas por estas células podem provocar danos ao tecido muscular íntegro que circunda a lesão e assim aumentar a área da lesão, gerando aumento da resposta inflamatória local (para revisão ver TIDBALL; WEHLING-HENRICKS, 2005).

Em condições patológicas tais como nas miopatias e nas distrofias, além da lesão provocada pelo excesso do íon cálcio no interior das fibras musculares, a resposta inflamatória excessiva também pode promover mionecrose. A inibição das células inflamatórias pode diminuir a degeneração e a necrose do tecido muscular. Estudos utilizando antiinflamatórios mostram redução significativa da mionecrose em músculos esqueléticos de camundongos *mdx* (HODGETTS et al., 2006; RADLEY; GROUNDS, 2006).

Dentre os mecanismos moleculares envolvidos na resposta inflamatória na DMD e no camundongo *mdx*, destaca-se a via de sinalização do fator de transcrição nuclear kappa-B (NF- κ B), cuja principal via de atuação é a ativação de citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina IL-1 β (KUMAR; BORIEK, 2003). Experimentos constataram aumento da expressão do TNF- α nos músculos de pacientes distróficos e dos camundongos *mdx* (GROUNDS et al., 2008). Tem sido proposto que o aumento exacerbado de TNF- α conduz a degeneração muscular nas fibras distróficas (HODGETTS et al., 2006; RADLEY; GROUNDS, 2006).

Considera-se também que o TNF- α é um dos mais importantes indutores de NF- κ B, contribuindo para um feedback positivo (MESSINA et al., 2006).

Em nossos experimentos, verificamos aumento da expressão do TNF- α nas fibras musculares distróficas, o que está de acordo com outros trabalhos realizados por nosso grupo de pesquisa e também de outros pesquisadores (DE SENZI MORAES PINTO et al., 2013; TONON et al., 2012; GROUNDS et al., 2008). Em relação aos tratamentos propostos, a CoQ10 reduziu a expressão do TNF- α nos músculos TA e STN, porém a Nifedipina apresentou os melhores resultados, apresentando valores semelhantes ao controle. Colaborando com nossos resultados, animais experimentais distróficos por deficiência em disferlina apresentaram significativa redução no processo inflamatório e atenuação do processo de degeneração muscular após tratamento com CoQ10 (POTGIETER et al., 2011) e estudos constatarem ação anti-inflamatória da Nifedipina, além de sua função como bloqueador de cálcio (TAKASE et al., 2005; SARADA et al., 2012).

Com exceção do músculo TA, nos demais músculos (DIA e STN) a expressão do NF- κ B foi similar ao do TNF- α nas fibras musculares distróficas, demonstrando um feedback positivo entre eles como já descrito anteriormente (MESSINA et al., 2006). Somente no músculo DIA houve redução da expressão do NF- κ B após os tratamentos, enquanto que no músculo STN, a Nifedipina não teve efeito. Colaborando com nossos achados, Matsumori, Nunokawa e Sasayama (2000) observaram inibição da ativação do NF- κ B após tratamento com Nifedipina, enquanto outros pesquisadores verificaram o inverso, demonstraram uma ativação deste fator por bloqueadores de cálcio (EICKELBERG et al., 1999). Em adição, Carre-Pierrat e colaboradores (2011) também verificaram efeitos diferentes da Nifedipina dependendo do músculo analisado. Constataram efeito benéfico (redução no número de fibras com núcleo central) da administração de Nifedipina no músculo DIA, porém o mesmo tratamento apresentou efeito deletério no músculo EDL (extensor longo dos dedos), aumentando o

número de fibras com núcleo centralizado (CARRE-PIERRAT et al., 2011). Com relação a CoQ10, recentemente Tsai e colaboradores (2012) também observaram inibição do NF- κ B após tratamento com este antioxidante.

Outro parâmetro utilizado para a observação da resposta inflamatória distrófica foi à análise morfométrica das áreas de inflamação. A maioria dos tratamentos apresentou efeito benéfico, reduzindo esta área, embora somente no músculo DIA a redução tenha sido significativa. Este dado assemelha-se aos descritos anteriormente, onde se destaca a diferença de respostas dos músculos analisados.

5.4 Antioxidante

Em experimentos com camundongos *mdx*, observou-se peroxidação lipídica da membrana causada pelo aumento da produção de EROs no período que antecede o início da degeneração das fibras musculares (DISATNIK et al., 1998). O processo de peroxidação lipídica causa a destruição de lipídeos presentes na membrana celular, resultando na formação de peróxidos lipídicos e aldeídos, como malondialdeído (MDA) e o 4-hidroxinonenal (4-HNE; ESTERBAUER; CHEESEMAN, 1990). Muitos biomarcadores vêm sendo utilizados para avaliar o estresse oxidativo, dentre eles o MDA (ESTERBAUER; CHEESEMAN, 1990), dienos conjugados (DORMANDY; WICKENS, 1987), gases etano e pentano (FRANK; BAKER, 1980), isoprostanos (MORROW et al., 1995), 4-HNE (ESTERBAUER; SCHAUR; ZOLLNER, 1991), modificações de proteínas (LEVINE; WETZEL, 1994) e modificações no DNA (MARNETT, 1999). O 4-HNE é um dos maiores produtos finais da peroxidação lipídica e tem sido largamente aceito como um indutor de estresse oxidativo, estando envolvido na patogênese de várias doenças degenerativas como a doença de Alzheimer, aterosclerose e

câncer (UCHIDA, 2003; ESTERBAUER; SCHAUR; ZOLLNER, 1991). Em nossos experimentos, utilizamos a marcação com o 4-HNE para analisar a peroxidação lipídica decorrente da degeneração do músculo distrófico.

Com relação ao efeito antioxidante das drogas utilizadas, verificamos redução (embora não significativa) da expressão do 4-HNE após os tratamentos no músculo DIA. Especificamente com relação a Coenzima Q10, estudos recentes relataram que esta reduziu efetivamente as EROs intracelulares induzidas pela luz UV em células epiteliais do cristalino humano (KERNT et al., 2010) e em modelo de células neuronais e estresse oxidativo (SOMAYAJULU et al., 2005), demonstrando sua capacidade antioxidante. Em relação a DMD, estudos com pacientes distróficos demonstraram que a administração de CoQ10 promoveu melhora na função cardíaca, redução dos sintomas gerados pela DMD e restauração da capacidade física (FOLKERS et al., 1985, FOLKERS; SIMONSEN, 1995). Em acordo com este trabalho, experimentos com biópsias de músculos de pacientes distróficos verificaram redução na concentração da CoQ10, sugerindo que um tratamento com reposição dessa coenzima possa apresentar potencial efeito sobre a DMD (MILES et al., 2005). Com relação ao outro tratamento utilizado em nossos experimentos, a Nifedipina, estudos constataram redução do estresse oxidativo e aumento da atividade antioxidante após sua administração (YAMATO et al., 2011).

5.5 Cálcio

Como já descrito na introdução, trabalhos relatam aumento na concentração do Ca^{2+} em fibras musculares distróficas (TURNER et al., 1991; MALLOUK; JACQUEMOND; ALLARD, et al., 2000; ROBERT et al., 2001). Em acordo com esses estudos, observamos alteração da concentração de cálcio nos músculos distróficos em relação aos músculos controle.

Paralelamente, verificamos que tanto a nifedipina quanto a Coenzima Q10 teve efeito benéfico sobre os músculos distróficos, no que diz respeito à redução do cálcio total. Este resultado é sustentado por outros trabalhos que verificaram redução do cálcio intracelular em animais distróficos após tratamento com Nifedipina (FRAYSSE et al., 2004; MULÈ et al., 2001, MULÈ; SERIO, 2001) e diminuição deste íon em córtex cerebral de ratos tratados com CoQ10 (CHANG; HUANG; WANG, 2012).

5.6 Qual o melhor tratamento?

A DMD é caracterizada por ciclos de degeneração e regeneração muscular, conduzindo a uma perda da força e função muscular (ENGEL; YAMAMOTO; FISCHBECK, 1994) Os efeitos positivos das drogas utilizadas em nossos experimentos podem estar relacionados à suas ações direta ou indireta sobre o processo de regeneração muscular, inflamação e/ou manutenção do cálcio.

Algumas importantes considerações foram obtidas com o presente estudo. Primeiramente, que os dois medicamentos utilizados, a CoQ10 e a Nifedipina, apresentam efeitos positivos e negativos. Segundo, que a associação desses dois medicamentos não apresenta resultados mais efetivos do que quando administrados separadamente.

Se considerarmos a Nifedipina, embora inúmeros estudos tenham sido realizados para investigar os efeitos dos bloqueadores de cálcio no tratamento da DMD, os resultados ainda divergem (para revisão ver PHILLIPS; QUINLIVAN, 2008). Em nossas condições experimentais observamos que a Nifedipina apresentou efeitos benéficos sobre as fibras musculares distróficas. Sugerimos que o principal mecanismo pelo qual a Nifedipina apresentou este resultado, seja através de sua ação bloqueadora sobre os canais de cálcio do tipo-L. Uma vez que, recentes estudos indicam que no

músculo esquelético o canal de cálcio tipo-L é a principal entrada de cálcio (BANNISTER; PESSAH; BEAM, 2009). Além disso, outro possível mecanismo da Nifedipina é seu efeito sobre o NF- κ B. Quando não estimulado, o fator NF- κ B, encontra-se no citoplasma ligado a uma proteína inibitória (I κ B), a qual impede sua translocação para o núcleo. Assim, a fosforilação e a degradação da I κ B são necessárias para que ocorra a translocação (GLEZER et al., 2003). Segundo Sarada e colaboradores (2012) a Nifedipina tem efeito anti-inflamatório por inibir a degradação da I κ B.

Com relação a CoQ10, esta também apresentou potencial efeito sobre as fibras distróficas, preferencialmente no processo inflamatório. A ação anti-inflamatória da Coq10 também já foi observada em outros estudos (SCHEMELZER et al., 2008; TSAI et al., 2012). Sugere-se que seu mecanismo anti-inflamatório deve-se a sua habilidade de inibir a ativação do NF- κ B por reduzir o nível de EROs (SCHEMELZER et al., 2008). Recentemente, Tsai e colaboradores (2012) demonstraram outra via de atuação da CoQ10 na resposta inflamatória, ao sugerir que a CoQ10 modula a sinalização do óxido nítrico (NO). O NO inibe a clivagem da I κ B e ativação do NF- κ B (MARSHALL; MERCHANT; STAMLER, 2000). No entanto, é importante destacar que a relação entre o NO e a inflamação é complexa, uma vez que, o NO é citotóxico em altas concentrações e protetor em baixo nível.

No que diz respeito à associação dos dois medicamentos, alguns autores sugerem que pode haver interações farmacocinéticas entre eles e que o efeito da Nifedipina poderia ser reforçado pela administração de CoQ10 (HODGSON et al, 2002; ROSENFELDT et al., 2003). Segundo Nishimura e colaboradores (2010), a concentração de Nifedipina foi maior no plasma de ratos tratados com Nifedipina e CoQ10 quando comparada ao controle. No entanto, em nossas condições experimentais a associação não demonstrou maior efeito das drogas sobre as fibras musculares distróficas.

Possivelmente, a dosagem dos fármacos utilizada em nossos experimentos contribuiu efetivamente com este resultado.

Diante do exposto, acreditamos que são necessários estudos futuros para se verificar qual é a dosagem e o tempo de tratamento adequados para se obter o melhor efeito destas drogas administradas isoladamente ou em conjunto.

6. CONCLUSÃO

O tratamento precoce com Nifedipina e/ou Coq10 atenua os efeitos deletérios (mionecrose, inflamação e estresse oxidativo) nos músculos distróficos de camundongos *mdx*, sugerindo que esses fármacos possam ser potencialmente úteis para o tratamento farmacológico da distrofinopatias.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

BANI, C.; LAGROTA-CANDIDO, J.; PINHEIRO, D.F.; LEITE, P.E.; SALIMENA, M.C.; HENRIQUES-PONS, A.; QUIRICO-SANTOS, T. Pattern of metalloprotease activity and myofiber regeneration in skeletal muscles of *mdx* mice. **Muscle Nerve**, v.37, n.5, 583-92, 2008

BANNISTER, R. A.; PESSAH, I. N.; BEAM, K. G. The skeletal L-type Ca(2+) current is a major contributor to excitation-coupled Ca(2+) entry. **J Gen Physiol**, v. 133, n. 1, 79–91, 2009.

BENTINGER, M.; BRISMAR, K.; DALLNER, G. The antioxidant role of coenzyme Q. **Mitochondrion**, v.7 Suppl: S41-50. 2007.

BHAGAVAN, H.N.; CHOPRA, R.K. Coenzyme Q10: Absorption, tissue uptake, metabolism and pharmacokinetics. **Free Radic Res**, v.40, 445–53, 2006.

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 Research**, v. 401, 88-106, 2002.

BODENSTEINER, J.B.; ENGEL, A.G., Intracellular calcium accumulation in Duchenne dystrophy and other myopathies: a study of 567,000 muscle fibers in 114 biopsies. **Neurology**, v. 28, 439-446, 1978.

BOGDANOVICH, S.; PERKINS, K.J.; KRAG, T.O.B.; KHURANA, T.S. Therapeutics for Duchenne muscular dystrophy: current approaches and future directions. **J Mol Med**, v. 82, 102-115, 2004.

BOOTMAN, M.D.; COLLINS, T.J.; PEPPIATT, C.M.; PROTHERO, L.S.; MACKENZIE, L.; BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**. v. 72, 248-254, 1976.

BOOTMAN, M.D.; LIPP, P.; BERRIDGE, M.J. The organisation and functions of local Ca(2+) signals. **J Cell Sci**, v.114, n. 12, 2213-22, 2001.

BROOKES, P.S.; YOON, Y.; ROBOTHAM, J.L.; ANDERS, M.W.; SHEU, S.S. Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 287, 817-833, 2004.

BRUNTON, L.B.; LAZO, J.S.; PARKER, K.L; (eds). **Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 11th ed. New York: McGraw-Hill; 2005.

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

BUSHBY, K.; FINKEL, R.; BIRNKRANT, D.J.; CASE, L.E.; CLEMENS, P.R.; CRIPE, L.; KAUL, A.; KINNETT, K.; MCDONALD, C.; PANDYA, S.; POYSKY, J.; SHAPIRO, F.; TOMEZSKO, J.; CONSTANTIN, C.; DMD CARE CONSIDERATIONS WORKING GROUP.WORKING GROUP. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and pharmacological and psychosocial management. **The Lancet Neurology**, v.9, n. 1, 77-93, 2010.

CARRE-PIERRAT. M.; LAFOUX, A.; TANNIOU, G.; CHAMBONNIER, L.; DIVET, A.; FOUGEROUSSE, F.; HUCHET-CADIOU, C.; SÉGALAT, L. Pre-clinical study of 21 approved drugs in the *mdx* mouse. **Neuromuscul Disord**, v. 21, n. 5, 313-27, 2011.

CHANG, Y.; HUANG, S.K.; WANG, S. J. Coenzyme Q10 inhibits the release of glutamate in rat cerebrocortical nerve terminals by suppression of voltage-dependent calcium influx and mitogen-activated protein kinase signaling pathway. **J Agric Food Chem**, v. 60, n. 48, 11909-18, 2012.

CHATURVEDI, R.K.; BEAL, M.F. Mitochondrial approaches for neuroprotection. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1147, 395-412, 2008.

CONKLIN, K.A. Coenzyme q10 for prevention of anthracycline-induced cardiotoxicity. **Integr Cancer Ther**, v.4, n.2, 110-30, 2005.

CRANE, F. Biochemical functions of coenzyme Q10. **J Am Coll Nutr**, v. 20, n.6, 591-8, 2001.

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

D'ANGELO, M.G.; GANDOSSINI, S. Growth in Duchenne Muscular Dystrophy. In: **Handbook of Growth and Growth Monitoring in Health and Disease**, 2012, pp. 2129 – 2153.

DE SENZI MORAES PINTO, R.; FERRETTI, R.; MORAES, L.H.; NETO, H.S.; MARQUES, M.J.; MINATEL, E. N-Acetylcysteine treatment reduces TNF- α levels and myonecrosis in diaphragm muscle of *mdx* mice. **Clin Nutr**, v.32, n.3, 472-5, 2013.

DESNUELLE, C.; RENAUD, J.F.; DELPONT, E.; SERRATRICE, G.; LAZDUNSKI, M. [H-3] nitrendipine receptors as markers of a class of putative voltage-sensitive CA²⁺ channels in normal human skeletal-muscle and in muscle from duchenne muscular-dystrophy patients. **Muscle Nerve**, v.9, 148-151, 1986.

DISATNIK, M.H.; DHAWAN, J.; YU et al. Evidence of oxidative stress in *mdx* mouse muscle: Studies of the pre-necrotic state. **J Neurol Sci**, v.161, 77-84, 1998.

DORMANDY, T.L.; WICKENS, D.G. The experimental and clinical pathology of diene conjugation. **Chem Phys Lipids**, v. 45, n. 2-4, 353-64, 1987.

EICKELBERG, O.; ROTH, M.; MUSSMANN, R.; RÜDIGER, J.J.; TAMM, M.; PERRUCHOUD, A.P.; BLOCK, L.H. Calcium channel blockers activate the interleukin-6 gene via the transcription factors NF-IL6 and NF-kappaB in primary human vascular smooth muscle cells. **Circulation**. v. 99, n. 17, 2276-82, 1999.

ENGEL, A. G.; YAMAMOTO, M.; FISCHBECK, K.H. Distrophinopathies. In: ENGEL, A.G.; FRANZINI-ARMSTRONG, C. **Myology**. New York: 1994. p. 1133-1187.

ERTEL, E.A.; CAMPBELL, K.P.; HARPOLD, M.M.; HOFMANN, F.; MORI, Y.; PEREZ-REYES, E.; SCHWARTZ, A.; SNUTCH, T.P.; TANABE, T.; BIRNBAUMER, L.; TSIEN, R.W.; CATTERALL, W.A. Nomenclature of voltage-gated calcium channels. **Neuron**, v. 25, n.3, 533-5. 2000.

ESTERBAUER, H.; SCHAUR, R.J.; ZOLLNER, H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. **Free Radic Biol Med**. v.11, n.1, 81-128, 1991.

ESTERBAUER, H.; CHEESEMAN, K.H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. **Methods Enzymol**, v.186, 407-21, 1990.

FOGAGNOLO MAURICIO, A.; MINATEL, E.; SANTO NETO, H.; MARQUES, M.J. Effects of fish oil containing eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on dystrophic *mdx* mice. **Clin Nutr.** 2012 Nov 23. doi: 10.1016/j.clnu.2012.11.013

FOLKERS, K.; SIMONSEN, R. Two successful double-blind trials with coenzyme Q10 (vitamin Q10) on muscular dystrophies and neurogenic atrophies. **Biochim Biophys Acta**, v.1271, 281-286, 1995.

FOLKERS, K.; WOLANIUK, J.; SIMONSEN, R.; MORISHITA, M.; VADHANAVIKIT, S. Biochemical rationale and the cardiac response of patients with muscle disease to therapy with coenzyme Q10. **Medical Sciences**, v.82, 4513-4516, 1985.

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, 673-676, 1990.

FOUAD, A.A.; AL-SULTAN, A.I.; REFAIE, S.M.; YACOUBI, M.T. Coenzyme Q10 treatment ameliorates acute cisplatin nephrotoxicity in mice. **Toxicology**, v. 274, n.1-3, 49-56, 2010.

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

FRANK, O.; BAKER, H. Vitamin profile in rats fed stock or liquid ethanolic diets. **Am J Clin Nutr**, v. 33, n. 2, 221-6, 1980.

FRAYSSE, B.; LIANTONIO, A.; CETRONE, M.; BURDI, R.; PIERNO, S.; FRIGERI, A.; PISONI, M.; CAMERINO, C.; DE LUCA, A. The alteration of calcium homeostasis in adult dystrophic *mdx* muscle fibers is worsened by a chronic exercise in vivo. **Neurobiol Dis**, v. 17, n. 2, 144-54, 2004.

GHIADONI, L.; MAGAGNA, A.; VERSARI, D.; KARDASZ, I.; HUANG, Y.; TADDEI, S.; SALVETTI, A. Effect of Antihypertensive drugs on conduit artery endothelial function. **Hypertension**. v. 41, 1281-1286, 2003.

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

GISSEL, H. The role of Ca²⁺ in muscle cell damage. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1066, 166-80, 2005.

- GLEZER, I.; ZEKKI, H.; SCAVONE, C.; RIVEST, S. Modulation of the innate immune response by NMDA receptors has neuropathological consequences. **J Neurosci**. 2003 Dec 3;23(35):11094-103.
- GROTE, K.; FLACH, I.; LUCHTEFELD, M.; AKIN, E.; HOLLAND, S.M.; DREXLER, H.; SCHIEFFER, B. Mechanical stretch enhances mRNA expression and proenzyme release of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) via NAD(P)H oxidase-derived reactive oxygen species. **Circ Res**, v. 92, n. 11, 80-86, 2003.
- GROUND, M.D.; RADLEY, H.G.; LYNCH, G.S.; NAGARAJU, K.; DE LUCA, A. Towards developing standard operating procedures for pre-clinical testing in the *mdx* mouse model of Duchenne muscular dystrophy. **Neurobiol Dis**. v. 31, n.1, 1-19. 2008.
- HAMER, P.W.; McGEACHIE, J.M.; DAVIES, M.J.; GROUND, M.D. Evans blue dye as an in vivo marker of myofibre damage: optimizing parameters for detecting initial myofibre membrane permeability. **J Anat**. v. 200, 69-79, 2002.
- HASLETT, J.N.; KANG, P.B.; HAN, M.; KHO, A.T.; SANODOU, D.; VOLINSKI, J.M.; BEGGS, A.H.; KOHANE, I.S.; KUNKEL, L.M. The influence of muscle type and dystrophin deficiency on murine expression profiles. **Mamm Genome**. v.16, n. 10, 739-48. 2005.
- HATHCOCK, J.N.; SHAO, A. Risk assessment for coenzyme Q10 (Ubiquinone). **Regul Toxicol Pharmacol**, v.45, n.3, 282-8. 2006.
- HAUSER, E.; HÖGER, H.; BITTNER, R.; WIDHALM, K.; HERKNER, K.; LUBEC, G. Oxyradical damage and mitochondrial enzyme activities in the *mdx* mouse. **Neuropediatrics**, v.26, n.5, 260-2, 1995.
- HAYCOCK, J.W.; MACNEIL, S.; JONES, P.; HARRIS, J.B.; MANTLE, D. Oxidative damage to muscle protein in Duchenne muscular dystrophy. **Neuroreport**, v.8, n. 1, 357-61, 1996.
- HIDAKA, T.; FUJII, K.; FUNAHASHI, I.; FUKUTOMI, N.; HOSOE, K. Safety assessment of coenzyme Q10 (CoQ10). **Biofactors**, v.32, n.1-4, 199-208. 2008
- HODGETTS, S.; RADLEY, H.; DAVIES, M.; GROUND, M. D. Reduced necrosis of dystrophic muscle by depletion of host neutrophils, or blocking TNF α function with Etanercept in *mdx* mice. **Neuromuscul Disord**, v.16, n. 9-10, 591-602, 2006.

HODGSON, J.M.; WATTS, G.F.; PLAYFORD, D.A.; BURKE, V.; CROFT, K. D. Coenzyme Q10 improves blood pressure and glycaemic control: a controlled trial in subjects with type 2 diabetes. **Eur J Clin Nutr**, v.56, n. 11, 1137-42, 2002.

HOHENHAUS, E.; NIROOMAND, F.; GOERRE, S.; VOCK, P.; OELZ, O.; BÄRTSCH, P. Nifedipine does not prevent acute mountain sickness. **Am J Respir Crit Care Med**. v. 150, n. 3, 857-60, 1994.

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

IRINTCHEV, A.; WERNIG, A. Muscle damage and repair in voluntarily running mice: strain and muscles differences. **Cell Tissue Res**, v. 249, n.3, 509-21, 1987.

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

JAVESGHANI, D.; MAGDER, S.A.; BARREIRO, E.; QUINN, M.T.; HUSSAIN, S.N. Molecular characterization of a superoxide-generating NAD(P)H oxidase in the ventilator muscles. **Am J Respir Crit Care Med**, v.165, n.3, 412-418, 2002.

JOHNSON, P.L.; BHATTACHARYA, S.K. Regulation of membrane-mediated chronic muscle degeneration in dystrophic hamsters by calcium-channel blockers: diltiazem, nifedipine and verapamil. **Journal of the Neurological Sciences**, v 115, 76-90, 1993.

JØRGENSEN, L.H.; BLAIN, A.; GREALLY, E.; LAVAL, S.H.; BLAMIRE, A.M.; DAVISON, B.J.; BRINKMEIER, H.; MACGOWAN, G.A.; SCHRØDER, H.D.; BUSHBY, K.; STRAUB, V.; LOCHMÜLLER, H. Long-term blocking of calcium channels in *mdx* mice results in differential effects on heart and skeletal muscle. **Am J Pathol**. v.178, n.1, 273-83, 2011.

KATIRJI, B. Cauda equina schwannoma misdiagnosed as focal motor neuron disease. **J Clin Neuromuscul Dis**, v.3, n.1, 36-8, 2001.

KERNT, M. et al. Coenzyme Q10 prevents human lens epithelial cells from light-induced apoptotic cell death by reducing oxidative stress and stabilizing BAX/Bcl-2 ratio. **Acta Ophthalmologica**, v. 88, 78-86, 2010.

- KIM, J.M.; PARK, E. Coenzyme Q10 attenuated DMH-induced precancerous lesions in SD rats. **J Nutr Sci Vitaminol**, v. 56, n.2, 139-44, 2010.
- KUMAR, A.; BORIEK, A.M. Mechanical stress activates the nuclear factor-kappaB pathway in skeletal muscle fibers: A possible role in Duchenne muscular dystrophy. **Faseb J**, v. 17, 386-396, 2003.
- KUMAR, A.; KAUR, H.; DEVI, P.; MOHAN, V. Role of coenzyme Q10 (CoQ10) in cardiac disease, hypertension and Meniere-like syndrome. **Pharmacol Ther**, v. 124, n. 3, 259-68, 2009.
- LAPIDOS, K. A.; KAKKAR, R.; MCNALLY, E. M. The dystrophin glycoprotein complex: signaling strength and integrity for the sarcolemma. **Circ Res**, v. 94, n. 8, 1023-31, 2004.
- LENAZ, G.; FATO, R.; FORMIGGINI, G.; GENOVA, M.L. The role of Coenzyme Q in mitochondrial electron transport. **Mitochondrion**, v.7 Suppl: S8-33. 2007.
- LEVINE, S.M.; WETZEL, D.L. In situ chemical analyses from frozen tissue sections by Fourier transform infrared microspectroscopy. Examination of white matter exposed to extravasated blood in the rat brain. **Am J Pathol**, v.145, n. 5, 1041-7, 1994.
- MALLOUK, N.; JACQUEMOND, V.; ALLARD, B. Elevated subsarcolemmal Ca²⁺ in *mdx* mouse skeletal muscle fibers detected with Ca²⁺-activated K⁺ channels. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.97, 4950-4955, 2000.
- MARCOFF, L.; THOMPSON, P.D. The role of coenzyme Q10 in station-associated myopathy. **J. American College Cardiology**, v.49, 2231-2237, 2007.
- MARNETT, L.J. Chemistry and biology of DNA damage by malondialdehyde. **IARC Sci Publ**, v. 150, 17-27. 1999
- MARQUES, M.J., MACHADO, R.V et al. Disodium cromoglycate protects dystrophindeficient muscle fibers from leakiness. **Muscle Nerve**, v.37, n.1, 61-7. 2008.
- MARQUES, M.J.; FERRETTI, R.; VOMERO, V.U.; MINATEL, E.; NETO, H.S. Intrinsic laryngeal muscles are spared from myonecrosis in the *mdx* mouse model of Duchenne muscular dystrophy. **Muscle Nerve**, v. 35, n.3, 349-53. 2007b.

MARQUES, M.J.; MINATEL, E.; GUIMARÃES, A.O.; NETO, H. S. Distribution of calcitonin gene-related peptide at the neuromuscular junction of *mdx* mice. **Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol**, v. 279, n. 2, 798-803, 2004.

MARQUES, M.J.; OGGIAM, D.S.; BARBIN, I.C.; FERRETTI, R.; SANTO NETO, H. Long-term therapy with deflazacort decreases myocardial fibrosis in *mdx* mice. **Muscle Nerve**, v.40, n. 3, 466-8, 2009.

MARQUES, M.J.; PERTILLE, A.; CARVALHO, C.L.; SANTO NETO, H. Acetylcholine receptor organization at the dystrophic extraocular muscle neuromuscular junction. **Anat Rec (Hoboken)**, v.290, n.7, 846-54, 2007a.

MARSHALL, H. E.; MERCHANT, K.; STAMLER, J. S. Nitrosation and oxidation in the regulation of gene expression. **FASEB J**, v14, n. 13, 1889–900, 2000.

MATSUDA, R.; NISHIKAWA, A. et al. Visualization of dystrophic muscle fibers in *mdx* mouse by vital staining with Evans blue: evidence of apoptosis in dystrophin-deficient muscle. **J Biochem**, v.118, n.5, 959-64, 1995.

MATSUMORI, A.; NUNOKAWA, Y.; SASAYAMA, S. Nifedipine inhibits activation of transcription factor NF- κ -B. **Life Sciences**, v. 67, 2655-2661, 2000.

MATSUMURA, C.Y.; PERTILLE, A.; ALBUQUERQUE, T.C.; SANTO NETO, H.; MARQUES, M.J., Diltiazem and verapamil protect dystrophin-deficient muscle fibers of *MDX* mice from degeneration: a potential role in calcium buffering and sarcolemmal stability. **Muscle Nerve**, v. 39, n. 2, 167-76, 2009.

MCGEACHIE, J.K.; GROUNDS, M.D.; PARTRIDGE, T.A.; MORGAN, J.E. Age-related changes in replication of myogenic cells in *mdx* mice: quantitative autoradiographic studies. **J Neurol Sci**. v. 119, n. 2, 169-79, 1993.

MECHLER, F.; IMRE, S.; DIOSZEGHY, P. Lipid peroxidation and superoxide dismutase activity in muscle and erythrocytes in Duchenne muscular dystrophy. **J Neurol Sci**, v. 63, n. 3, 279-83, 1984.

MENDELL, J.R.; ENGEL, W.K.; DERRER, E.C. Duchenne muscular dystrophy: functional ischemia reproduces its characteristic lesions. **Science**, v.172, n.88, 1143-5, 1971.

MESSINA, S.; BITTO, A.; AGUENNOUZ, M.; MINUTOLI, L.; MONICI, M.C.; ALTAVILLA, D.; SQUADRITO, F.; VITA, G. **Experimental Neurology**, v. 198, 234-241, 2006.

MILES, L.; MILES, M.V.; TANG, P.H. et al. Muscle coenzyme q: a potential test for mitochondrial activity and redox status. **Pediatric Neurol**, v.32, 318-324, 2005.

MINATEL, E.; NETO, H.S.; MARQUES, M.J. Acetylcholine receptor distribution and synapse elimination at the developing neuromuscular junction of *mdx* mice. **Muscle Nerve**, v.28, n. 5, 561-569, 2003.

MIQUEL, R.; GISBERT, R.; SERNA, E.; PEREZ-VIZCAINO, F.; ANSELM, E.; NOGUEIRA, M.A.; IVORRA, M.D.; D'OCÓN, M.P. Acute and chronic Captopril, but not Prazosin or Nifedipine, normalize alterations in adrenergic intracellular Ca²⁺ handling observed in the mesenteric arterial tree of spontaneously hypertensive rats. **JPET**, v. 313, 359-367, 2005.

MORROW, J.D.; FREI, B.; LONGMIRE, A.W.; GAZIANO, J.M.; LYNCH, S.M.; SHYR, Y.; STRAUSS, W.E.; OATES, J.A.; ROBERTS, L.J. 2nd. Increase in circulating products of lipid peroxidation (F₂-isoprostanes) in smokers. Smoking as a cause of oxidative damage. **N Engl J Med**. v. 332, n. 18, 1198-203, 1995.

MOXLEY, R.T. Absence of major side-effects of nifedipine following treatment of duchenne dystrophy. **Pediatrics**, v.75, 1168-1169, 1985.

MOXLEY, R.T.; BROOKE, M.H.; FENICHEL, G.M.; MENDELL, J.R.; GRIGGS, R.C.; MILLER, J.P.; PROVINCE, M.A.; PATTERSON, V. Clinical investigation in duchenne dystrophy. VI. double-blind controlled trial of nifedipine. **Muscle Nerve**, v. 10, 22-33, 1987.

MULÈ, F.; SERIO, R; Increased calcium influx is responsible for the sustained mechanical tone in colon from dystrophic (*mdx*) mice. **Gastroenterology**, v. 120, n. 6, 1430-7, 2001.

MULÈ, F.; VANNUCCHI, M.G.; CORSANI, L.; SERIO, R. et al. Myogenic NOS and endogenous NO production are defective in colon from dystrophic (*mdx*) mice. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 281, 1264–1270, 2001.

MURPHY, M.E.; KEHRER, J.P. Oxidative stress and muscular dystrophy. **Chem Biol Interact**, v. 69, 101-178, 1989.

- NAKAE, Y.; STOWARD, P.J.; KASHIYAMA, T.; SHONO, M.; AKAGI, A.; MATSUZAKI, T.; NONAKA, I. Early onset of lipofuscin accumulation in dystrophin-deficient skeletal muscles of DMD patients and *mdx* mice. **J Mol Histol**, v.35, n.5, 489-99, 2004.
- NIEBRÓJ-DOBOSZ, I.; FIDZIAŃSKA, A.; GLINKA, Z.; HAUSMANOWA-PETRUSEWICZ, I. Is the normal content of sulfhydryl groups attributable to sparing from dystrophic pathology in dystrophin-deficient muscles? **Folia Neuropathol**, v.40, n.3, 143-50, 2002.
- NISHIMURA, A.; FUJIMURA, M.; HASEGAWA, F.; SHIBATA, N. Pharmacokinetic interaction between Nifedipine and Coenzyme Q10 in rats: A new type of drug-supplement interaction. **J of Health Science**, v. 56, n. 3, 310-320, 2010.
- OKUDA, N.; HAYASHI, T.; MORI, T.; INAMOTO, S.; OKABE, M.; MIENO, S.; HORIMOTO, H.; KITAURA, Y. Nifedipine enhances the cardioprotective effect of an angiotensin-II receptor blocker in an experimental animal model of heart failure. **Hypertens Res**, v.28, n.5, 431-8, 2005.
- OVERVAD, K.; DIAMANT, B.; HOLM, L.; HOLMER, G.; MORTENSEN, S.A.; STENDER, S. Coenzyme Q10 in health and disease. **Eur J Clin Nutr**, v. 53, n.10, 764-70, 1999.
- PASTORET, C.; SEBILLE, A. Age-related differences in regeneration of dystrophic (*mdx*) and normal muscle in the mouse. **Muscle Nerve**, v.18, n.10, 1147-54, 1995.
- PETROF, B.J. Molecular pathophysiology of myofiber injury in deficiencies of the dystrophinglycoprotein complex. **Am J Phys Med Rehabil**, v.81 (Suppl), S162-S174, 2002.
- PHILLIPS, M.F.; QUINLIVAN, R. Calcium antagonists for Duchenne muscular dystrophy. **Cochrane Database Syst Rev**, v.4, CD004571, 2008.
- 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 Genetics**, v. 12, n.15, 1813-1821, 2003.
- POTGIETER, M.; PRETORIUS, E.; MERWE, V. et al. Histological assessment of SJL/J mice treated with the antioxidants coenzyme Q10 and resveratrol. **Micron**, v. 42, 275–282, 2011.

PRISK, V.; HUARD, J. Muscle injuries and repair: the role of prostaglandins and inflammation. **Histol Histopathol**, v.18, n.4, 1243-56, 2003

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

RAGUSA, R.J.; CHOW, C.K.; PORTER, J.D. Oxidative stress as a potential pathogenic mechanism in an animal model of Duchenne muscular dystrophy. **Neuromuscul Disord**, v.7, 379-386, 1997.

RAHEEM, I.A.; SAAID, R.; OMAR, S.Z.; TAN, P.C. Oral nifedipine versus intravenous labetalol for acute blood pressure control in hypertensive emergencies of pregnancy: a randomised trial. **BJOG**, v.119, n.1, 78-85. 2012

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

RANDO, T.A.; DISATNIK, M.H.; YU, Y.; FRANCO, A. Muscle cells from *mdx* mice have an increased susceptibility to oxidative stress. **Neuromuscul Disord**, v.8, 14-21, 1998.

RIVET, M.; COGNARD, C.; IMBERT, N.; RIDEAU, Y.; DUPORT, G.; RAYMOND, G. A third type of calcium current in cultured human skeletal muscle cells. **Neuroscience Letters**, v. 138, 97-102, 1992.

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, 4647-4651, 2001.

RODRIGUEZ, M.C.; TARNOPOLSKY, M.A. Patients with dystrophinopathy show evidence of increased oxidative stress. **Free Radical Biol. Med**, v. 34, 1217-1220, 2003.

ROJSTACZER, N.; TRIGGLE, D. J. Structure-function relationships of calcium antagonists: Effect on oxidative modification of low density lipoprotein. **Biochem Pharmacol**, v.51, n.2, 141-50, 1996.

ROSENFELDT, F.; HILTON, D.; PEPE, S.; KRUM, H. Systematic review of effect of coenzyme Q10 in physical exercise, hypertension and heart failure. **Biofactors**, v.18, n. 1-4, 91-100, 2003.

- ROSENFELDT, F.L.; HAAS, S.J.; KRUM, H.; HADJ, A.; NG, K.; LEONG, J.Y.; WATTS, G. F. Coenzyme Q10 in the treatment of hypertension: a meta-analysis of the clinical trials. **J Hum Hypertens**, v. 21, n. 4, 297-306, 2007.
- ROSSI, A.E.; DIRKSEN, R.T. Sarcoplasmatic reticulum: the dynamic calcium governor of muscle. **Muscle Nerve**, v.33, 715-731, 2006.
- SABOURIN, L.A.; RUDNICKI, M.A. The molecular regulation of myogenesis. **Clin Genet**. v. 57, n.1, 16-25, 2000.
- SARADA, K.S.S.; VEERAMOHAN, P. H.; MATHEW, T.; SAUMYA, S.; CHITHARANJAN, C. Nifedipine inhibits hypoxia induced transvascular leakage through down regulation of NFkB. **Respir Physiol Neurobiol**, v.183, n.1, 26-34. 2012.
- SCHMALBRUCH, H. Regenerated muscle fibers in Duchenne muscular dystrophy: A serial section study. **Neurology**, v.34, p.60-65, 1984.
- SCHMELZER C.; LORENZ, G.; LINDNER, I.; RIMBACH, G.; NIKLOWITZ, P.; MENKE, T.; DÖRING, F. Effects of Coenzyme Q10 on TNF-alpha secretion in human and murine monocytic cell lines. **Biofactors**, v.31, n.1, 35-41. 2007.
- SCHMELZER, C.; LINDNER, I.; RIMBACH, G.; NIKLOWITZ, P.; MENKE, T.; DÖRING, F. Functions of coenzyme Q10 in inflammation and gene expression. **Biofactors**, v. 32, n.1-4, 179-83, 2008.
- SEIXAS, S. L.; CÂNDIDO, J.L.; SARINO, W.; QUIRICO-SANTOS, T. Importância do camundongo *mdx* na fisiologia da distrofia muscular de Duchenne. **Arq Neuropsiquiatria**, v.55, n. 3-B, p.610-617, 1997.
- SHAVLAKADZE, T.; WHITE, J.; HOH, J.F.; ROSENTHAL, N.; GROUNDS, M.D.; Targeted expression of insulin-like growth factor-I reduces early myofiber necrosis in dystrophic *mdx* mice. **Mol Ther**, v.10, 829-843, 2004.
- SOMAYAJULU, M. et al. Role of mitochondria in neuronal cell death induced by oxidative stress; neuroprotection by Coenzyme Q10. **Neurobiology of Disease**, v.18, 618-627, 2005.

- SPENCER, M.J.; MELLGREN, R.L. Overexpression of a calpastatin transgene in *mdx* muscle reduces dystrophic pathology. **Hum Mol Genet**, v.11, n. 21, 2645-2655, 2002.
- SPINDLER, M.; BEAL, M.F.; HENCHCLIFFE, C. Coenzyme Q10 effects in neurodegenerative disease. **Neuropsychiatr Dis Treat**, v.5, 597-610, 2009.
- STRAUB, V.; RAFAEL, J.A.; CHAMBERLAIN, J.S; CAMPBELL, K.P. Animal models for muscular dystrophy show different patterns of sarcolemmal disruption. **J Cell Biol**, v. 139, n. 2, 375-385, 1997.
- SUNADA, Y.; CAMPBELL, K. Distrophin-glycoprotein complex: molecular organization and critical roles in skeletal muscle. **Curr. Opin. Neurol.**, v. 8, 379-385, 1995.
- TADDEI, S.; VIRDIS, A.; GHIADONI, L.; MAGAGNA, A.; PASINI, A.F.; GARBIN, U.; COMINACINI, L.; SALVETTI, A. Effect of calcium antagonist or beta blockade treatment on nitric oxide-dependent vasodilation and oxidative stress in essential hypertensive patients. **J Hypertens**, v. 19, n. 8, 1379-86, 2001.
- TAKASE, H.; TORIYAMA, T.; SUGIYAMA, M.; NAKAZAWA, A.; HAYASHI, K.; GOTO, T.; SUGIURA, T.; IKEDA, K.; SATO, S.; UEDA, R.; DOHI, Y. Effect of Nifedipine on C-Reactive Protein Levels in the Coronary Sinus and on Coronary Blood Flow in Response to Acetylcholine in Patients With Stable Angina Pectoris Having Percutaneous Coronary Intervention. **Am J Cardiol**, v. 95, 1235-1237, 2005.
- TANABE, Y.; ESAKI, K.; NOMURA, T. Skeletal muscle pathology in X chromosome-linked muscular dystrophy (*mdx*) mouse. **Acta Neuropathol (Berl)**, v. 69, 91-95, 1986.
- TIDBALL, J.G.; WEHLING-HENRICKS, M. Damage and inflammation in muscular dystrophy: potential implications and relationships with autoimmune myositis. **Curr Opin Rheumatol**, v.17, n.6, 707-13, 2005.
- TOMASETTI, M.; LITTARRU, G.P.; STOCKER, R.; ALLEVA, R. Coenzyme Q10 enrichment decreases oxidative DNA damage in human lymphocytes. **Free Radic Biol Med**, v.27, n.9-10, 1027-32, 1999.

TONON, E.; FERRETTI, R.; SHIRATORI, J.H.; SANTO NETO, H.; MARQUES, M.J.; MINATEL, E. Ascorbic acid protects the diaphragm muscle against myonecrosis in *mdx* mice. **Nutrition**. v.28, n. 6, 686-90, 2012.

TORRES, L. F.; DUCHEN, L. W. The mutant *mdx*: inherited myopathy in the mouse. Morphological studies of nerves, muscles and end-plates. **Brain**, v.110, 269-299, 1987.

TSAI, K.L.; HUANG, Y.H.; KAO, C.L.; YANG, D.M.; LEE, H.C.; CHOU, H.Y.; CHEN, Y.C.; CHIOU, G.Y.; CHEN, L.H.; YANG, Y.P.; CHIU, T.H.; TSAI, C.S.; OU, H.C.; CHIOU, S.H. A novel mechanism of coenzyme Q10 protects against human endothelial cells from oxidative stress-induced injury by modulating NO-related pathways. **J Nutr Biochem**. v. 23, n.5, 458-68, 2012.

TURNER, P.R.; FONG, P.; DENETCLAW, W.; STEINHARDT, R.A. Increase calcium influx in dystrophic muscle. **J Cell Biol**, v.115, n.6, 1701-1712, 1991.

UCHIDA, K. 4-Hydroxy-2-nonenal: a product and mediator of oxidative stress. **Prog Lipid Res**. v.42, n. 4, 318-43, 2003.

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, 1089-1096, 2002.

WALTER, M.C.; LOCHMÜLLER, H. Muscular Dystrophies. In: Schapira, A. H.V. **Neurology and Clinical Neuroscience**. Elsevier., 2007, p. 1142-1167.

WHITEHEAD, N.; YEUNG, E.W.; ALLEN, D.G. Muscle damage in *mdx* (dystrophic) mice: role of calcium and reactive oxygen species. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 33, 657-662, 2006.

WOOLF, P.J.; L.U, S.; CORNFORD-NAIRN, R.; WATSON, M.; XIAO, X.H.; HOLROYD, S.M.; BROWN, L.; HOEY, A.J. Alterations in dihydropyridine receptors in dystrophin-deficient cardiac muscle. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 290, n.6, 2439-45, 2006.

YAMATO, M.; SHIBA, T.; IDE, T.; HONDA, Y.; YAMADA, K.; TSUTSUI, H. Nifedipine treatment reduces brain damage after transient focal ischemia, possibly through its antioxidative effects. **Hypertens Res**. v. 34, n. 7, 840-5, 2011.

YONEDA, T.; TOMOFUJI, T.; EKUNI, D.; AZUMA, T.; ENDO, Y.; KASUYAMA, K.; MACHIDA, T.; MORITA, M. Anti-aging Effects of Co-enzyme Q10 on Periodontal Tissues. **J Dent Res**. 2013 May 21. [Epub ahead of print]

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, n. 2, 449-455, 2006.

ANEXO

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha **Dissertação de Mestrado** intitulada **"INFLUÊNCIA DA NIFEDIPINA E DA COENZMA Q10 NO PROCESSO DE DEGENERAÇÃO/REGENERAÇÃO MUSCULAR EM CAMUNDONGOS MDX"**:

(☒) não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.

Tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões):

() CIBio - Comissão Interna de Biossegurança , projeto nº _____, Instituição: _____.

(☒) CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais , projeto nº 2961-1, Instituição: UNICAMP.

() CEP - Comissão de Ética em Pesquisa, protocolo nº _____, Instituição: _____.

** Caso a Comissão seja externa ao IB/UNICAMP, anexar o comprovante de autorização dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.*

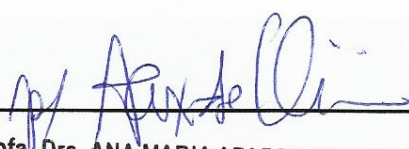

Aluno: Rafael Ramos de Burgos


Orientadora: Elaine Minatel

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

() Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura


Profa. Dra. ANA MARIA APARECIDA GUARALDO
Presidente da CEUA/UNICAMP

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

() Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura