

“IDEBENONA NO TRATAMENTO DAS FIBRAS MUSCULARES DISTRÓFICAS DE CAMUNDONGOS MDX EXERCITADOS”

Palavras-Chaves: antioxidante, músculo distrófico, exercício, estresse oxidativo, processo inflamatório.

Autoras:

Camilla Kaori Hayashi, FEnf- UNICAMP

Valeria Andrade Pereira, IB - UNICAMP

Dra. Heloína Nathalliê Mariano da Silva(co-orientador), IB - UNICAMP

Profa. Dra. Elaine Minatel(orientadora), IB - UNICAMP

INTRODUÇÃO:

A Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) é uma doença genética letal, causada por mutação no gene da proteína distrofina, promovendo uma degeneração muscular progressiva¹. Além da ausência da distrofina, estresse oxidativo e processo inflamatório são fatores que contribuem com a fisiopatogênese da DMD. Atualmente, o tratamento mais utilizado pelo paciente distrófico é a administração de glicocorticoides, porém seu uso prolongado produz diversos efeitos colaterais². Desta forma, é fundamental a busca por terapias paliativas que minimizem a evolução da doença, melhorem a qualidade de vida dos pacientes distróficos e ao mesmo tempo apresentem menos efeitos colaterais do que os glicocorticoides.

Recentemente nosso grupo de pesquisa reportou que o tratamento com Idebena, um potente antioxidante, reduziu os níveis de marcadores de estresse oxidativo (H₂O₂ e 4-HNE) e de moléculas envolvidas no processo inflamatório (NF-κB e TNF) em estudos in vitro com células musculares primárias distróficas³. Com base neste trabalho, o presente projeto propôs a avaliar os efeitos da Idebena em estudos in vivo com camundongos *mdx* submetidos ao exercício físico. Embora os camundongos *mdx* não apresentem distrofina, semelhante aos pacientes com DMD, esses animais desenvolvem uma forma mais leve de distrofia⁴. Assim, para obter um modelo animal mais próximo da distrofia humana, o fenótipo murino pode ser agravado por exercício crônico em esteira⁵. Para agravar o fenótipo do camundongo *mdx* utilizaremos o protocolo de exercício descrito^{6,7}, o qual promove comprometimento funcional indicado pelo declínio da força de prensão e características histopatológicas de agravamento de lesão muscular⁸.

OBJETIVO:

Analisar os efeitos da administração de Idebena sobre as fibras musculares de camundongos *mdx* adultos exercitados.

METODOLOGIA:

4.1 Animais

Foram utilizados camundongos machos da linhagem *mdx*, com 60 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. 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 (CEE-IB/UNICAMP).

4.2. Protocolo experimental

Foram utilizados camundongos da linhagem *mdx* (C57BL/10-Dmdmdx/PasUnib) com 7 semanas de idade. A idade escolhida foi baseada em protocolos de exercícios anteriores,⁴ divididos aleatoriamente em três grupos experimentais: (1) *mdx* controle sedentário (*mdx*Sed); (2) *mdx* submetido ao exercício (*mdx*E) e (3) *mdx* submetido ao exercício e tratado com Idebena (*mdx*E+I). O protocolo do exercício foi baseado em trabalhos anteriores²⁴ e nos protocolos TREAT-NMD para exercícios com camundongos *mdx*.

4.3 Testes funcionais

Foram realizados testes funcionais em todos os animais de cada grupo, os quais foram realizados em dois momentos do experimento: pré-tratamento: antes de começar o tratamento farmacológico e pós-tratamento. Alguns dos protocolos operacionais foram padronizados tendo como base as diretrizes contidas no TREAT-NMD (Disponível em: <http://www.treat->

md.edu/activities/treatment/html). Foram aplicados os seguintes testes funcionais: Avaliação da atividade locomotora espontânea (open-field test), Teste de retenção de quatro membros (four limb hanging test)

4.4 Dosagem de Creatina-Quinase (CK) em amostras de sangue

Foram utilizadas amostras de sangue coletadas por punção cardíaca que foram 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 o equipamento Multi-Mode Microplate Reader Model Synergy H1M (Bio-Tek Instruments) com comprimento de onda de 340 nm.

4.5 Análise Histomorfológica

O músculo sóleo foi retirado e congelado em isopentano resfriado a -159°C (nitrogênio líquido) e armazenado em biofreezer a -80°C. Para obtenção dos cortes em criostato (MicromHS505E) os músculos foram mantidos a -25°C, seccionados transversalmente em criostato na espessura de 8 µm e coletados em lâmina. Foram obtidas lâminas com 6 cortes dos referidos grupos experimentais. Foram utilizadas 02 lâminas para cada uma das análises descritas a seguir: Delimitação das áreas de inflamação, Quantificação de fibras em degeneração, Reação Dihydroetidio (DHE) para detecção de EROs (Radical ânion superóxido - O₂), Contagem de Grânulos de Lipofuscina.

4.6 Análise Estatística

Para análise estatística dos testes foi aplicado o teste ANOVA One Way seguido do teste Tukey para as devidas comparações entre os grupos, e os dados apresentados por meio de média e desvio padrão.

RESULTADOS PRELIMINARES:

1. Avaliação de Atividade Locomotora Espontânea (Open-Field Test)

Os animais dos grupos *mdxSed* e *mdxEx* apresentaram uma redução significativa na atividade locomotora espontânea no período pós-tratamento em comparação com o período pré-tratamento (Figura 1). Já os animais do grupo *mdxEx+Ide* não apresentaram diferenças significativas durante o período experimental.

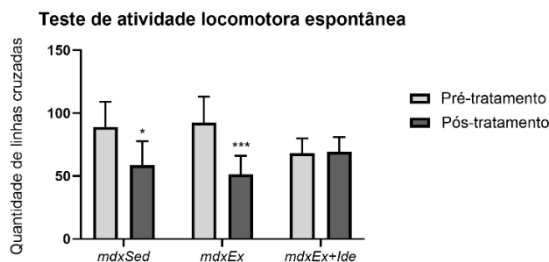


Figura 1: Avaliação da atividade locomotora espontânea (Open Field test) – pré e pós tratamento. *mdxSed*: Camundongos *mdx* controle sedentário; *mdxEx*: camundongos *mdx* submetidos ao exercício; *mdxEx+Ide*: camundongos *mdx* submetido ao exercício e tratado com Idebenona. Dados foram obtidos no período pré e pós-exercício e Idebenona. * $p < 0,005$ difere do grupo *mdxSed*; *** $p < 0,00001$ difere do grupo *mdxSed*; (one way Anova, pós teste de Tukey HSD).

2. Teste de Retenção dos 4 Membros (Four Limb Hanging Test)

Não foram observadas diferenças significativas nos resultados do teste de avaliação de retenção dos quatro membros, conforme observado na figura 2.

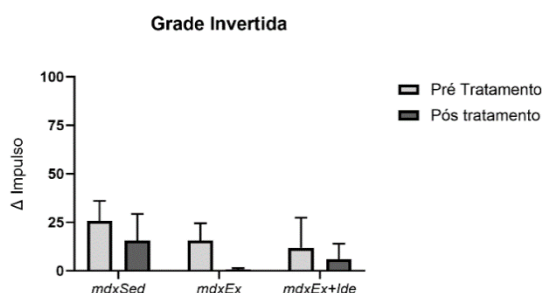


Figura 2: Avaliação da retenção dos quatros membros – pré e pós tratamento. *mdxSed*: Camundongos *mdx* controle sedentário; *mdxEx*: camundongos *mdx* submetidos ao exercício; *mdxEx+Ide*: camundongos *mdx* submetido ao exercício e tratado com Idebenona. Dados foram obtidos no período pré e pós-exercício e tratamento com Idebenona. Sem diferenças significativas (one way Anova, pós teste de Tukey HSD).

3. Análise bioquímica da degeneração muscular

Os animais do grupo *mdxEx* apresentaram aumento significativo (348,7%) nos níveis da enzima CK plasmática em relação ao grupo *mdxSed*. Por outro lado, os animais do grupo *mdxEx+Ide* apresentaram redução significativa (90,34%) nos níveis desta enzima em relação ao grupo *mdxEx* (Tabela 1).

Tabela 1: Dados referentes aos níveis da enzima CK plasmática.

	<i>mdxSed</i>	<i>mdxEx</i>	<i>mdxEx+Ide</i>
CK sanguíneo (U/L)	2214±836,7	9935±2605 ****	959,3±631,9 +++++

Valores dos níveis da enzima de CK plasmático são expressos como média ± desvio padrão. *mdxSed*: camundongos *mdx* controle sedentário; *mdxEx*: camundongos *mdx* submetidos ao exercício; *mdxEx+Ide*: camundongos *mdx* submetido ao exercício e tratado com Idebenona. Dados foram obtidos no período pós-exercício e tratamento com Idebenona **** p < 0,0001 difere do grupo *mdxSed*; +++++ p < 0,00001 difere do grupo *mdxEx* (one way Anova, pós teste de Tukey HSD).

4. Quantificação de fibras musculares em degeneração:

A degeneração muscular foi avaliada através da quantificação de fibras positivas ao IgG. Observa-se que o grupo *mdxEx* apresentou um aumento significativo (231,13%) em relação ao grupo *mdxSed*. Enquanto os animais do grupo *mdxEx+Ide* apresentaram uma redução significativa (49,59%) em relação ao grupo *mdxEx*.

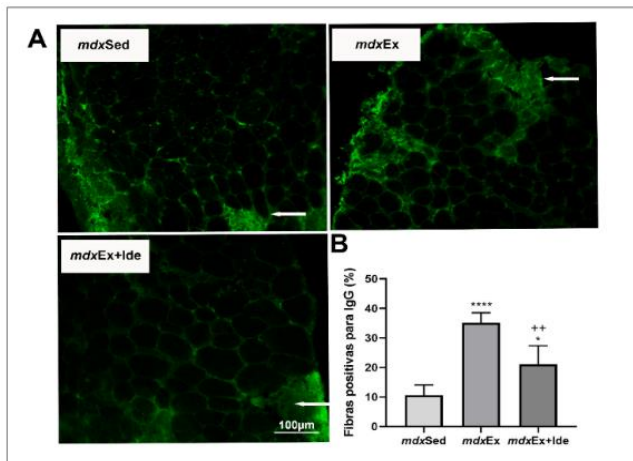


Figura 3: Fibras em degeneração com marcação positiva para IgG (seta branca). A – Cortes transversais do músculo sóleo dos três diferentes grupos experimentais: *mdxSed*: camundongos *mdx* controle sedentário; *mdxEx*: camundongos *mdx* submetidos ao exercício; *mdxEx+Ide*: camundongos *mdx* submetido ao exercício e tratado com Idebenona. B – Percentual de fibras positivas para IgG dos grupos *mdxSed*, *mdxEx*, *mdxEx+Ide*. Dados representados em média ± desvio padrão, **** p < 0,00001 difere do grupo *mdxSed*; ++ p < 0,001 difere do grupo *mdxEx*; * p < 0,005 difere do grupo *mdxSed* (one way Anova).

5. Quantificação de fibras musculares regeneradas

Os animais do grupo *mdxEx+Ide* apresentaram redução no número de núcleos centrais (indicativo de fibras regeneradas) (16,66%) e aumento do número de núcleos periféricos (indicativo de fibras normais) (35,48%) em relação ao grupo *mdxSed*.

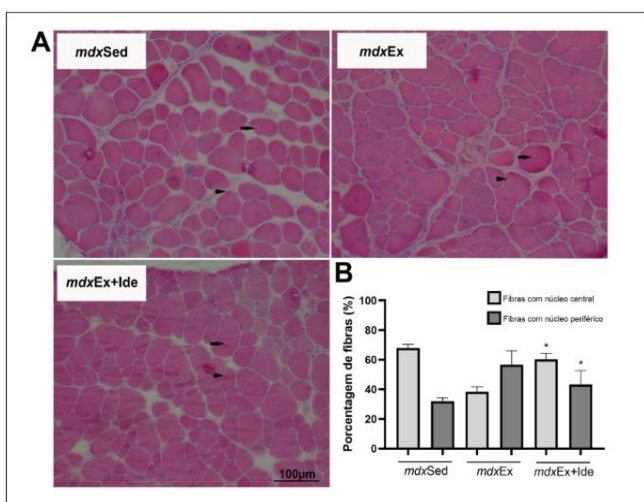


Figura 4: Coloração em HE, mostrando fibras com núcleo central (seta preta) e núcleo periférico (cabeça de seta). A - Cortes transversais do músculo sóleo dos diferentes grupos experimentais, *mdxSed*: camundongos *mdx* controle sedentário; *mdxEx*: camundongos *mdx* submetidos ao exercício; *mdxEx+Ide*: camundongos *mdx* submetido ao exercício e tratado com Idebenona. B- Percentual de fibras com núcleo periférico e centralizado dos grupos *mdxSed*, *mdxEx*, *mdxEx+Ide*. Dados representados em média ± desvio padrão. + p ≤ 0,05 difere do grupo *mdxEx* (one way Anova).

6. Determinação da área de inflamação

A área de inflamação foi obtida pela delimitação de regiões com aglomerados de células inflamatórias entre as fibras musculares em relação a área total do músculo. Quando comparadas às áreas de inflamação dos grupos experimentais (*mdxSed*, *mdxEx* e *mdxEx+Ide*), não foram encontradas diferenças significativas.

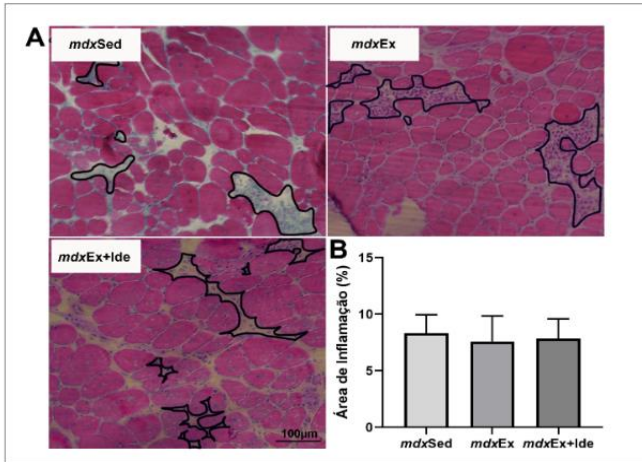


Figura 5 Coloração em HE, mostrando áreas de inflamação (área demarcada). A - Cortes transversais do músculo sóleo dos diferentes grupos experimentais, *mdxSed*: camundongos *mdx* controle sedentário; *mdxEx*: camundongos *mdx* submetidos ao exercício; *mdxEx+Ide*: camundongos *mdx* submetido ao exercício e tratado com Idebenona. B - Percentual da área de inflamação dos grupos *mdxSed*, *mdxEx*, *mdxEx+Ide*. Não houve diferenças significativas (one way Anova).

7. Análise do estresse oxidativo

Para avaliação do estresse oxidativo tecidual, foram analisados os grânulos de lipofuscina e DHE.

Os grânulos de lipofuscina são um pigmento acastanhado depositados nas fibras musculares, os quais podemos observar em abundância no músculo sóleo de camundongos *mdxEx* (40,83%) e *mdxEx+Ide* (49,55%) em relação ao grupo *mdxSed*.

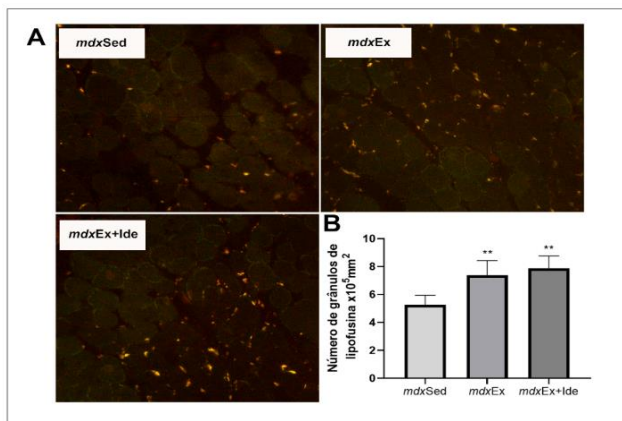


Figura 6: Grânulos de Lipofuscina. Cortes transversais do músculo sóleo dos diferentes grupos experimentais, *mdxSed*: camundongos *mdx* controle sedentário; *mdxEx*: camundongos *mdx* submetidos ao exercício; *mdxEx+Ide*: camundongos *mdx* submetido ao exercício e tratado com Idebenona. B. Gráfico mostra o volume de grânulos de Lipofuscina dos grupos experimentais. Dados representados em média \pm desvio padrão. ** $p < 0,01$ difere do grupo *mdxSed* (one way Anova).

Em termos da reação do DHE, observa-se que o grupo *mdxSed* apresentou menor fluorescência (indicativo de radicais ânion superóxido O_2^-) em relação ao grupo *mdxEx* (153,87%) e *mdxEx+Ide* (45%). O tratamento com IDE reduziu significativamente a marcação de DHE em comparação ao grupo *mdxEx* (42,64%).

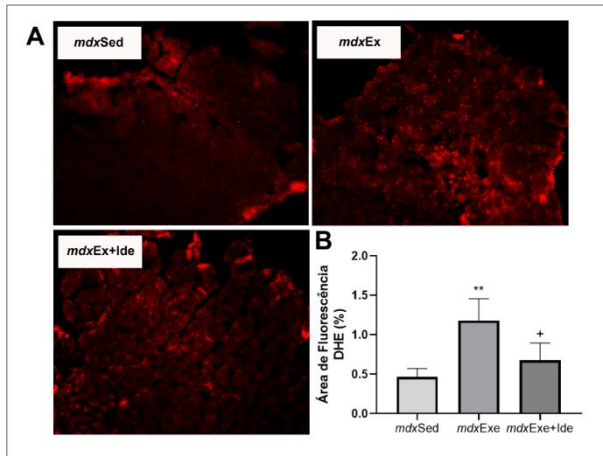


Figura 7: Intensidade de DHE. A. Cortes transversais do músculo sóleo dos diferentes grupos experimentais *mdxSed*: camundongos *mdx* controle sedentário; *mdxEx*: camundongos *mdx* submetidos ao exercício; *mdxEx+Ide*: camundongos *mdx* submetido ao exercício e tratado com Idebenona. Fluorescência de DHE. Aumento 10X. Escala 100µm. B. O gráfico mostra a intensidade de DHE dos grupos experimentais. Dados representados em média \pm desvio padrão. ** $p < 0,01$ difere do grupo *mdxSed*. + $p \leq 0,05$ difere do grupo *mdxEx* (one way Anova).

CONCLUSÃO:

Diante do exposto, os resultados demonstram os efeitos benéficos do tratamento com Idebenona no modelo experimental distrófico exercitado. Embora o tratamento com Idebenona não tenha apresentado efeitos no processo inflamatório, foram observadas reduções significativas quanto ao processo oxidativo, com base na diminuição da intensidade de DHE (indicativo de radicais ânion superóxido O₂), e também no processo de degeneração muscular, com base na análise de fibras positivas ao IgG, núcleos centrais (fibras musculares regeneradas) e a análise bioquímica da enzima CK. Esses efeitos benéficos da Idebenona no estágio estabelecido da doença, torna-a uma potencial terapia para a DMD, portando, uma opção viável para futuros estudos clínicos em pacientes distróficos.

REFERÊNCIAS:

1. ENGEL, A. G. Muscular Dystrophies. In: Engel A. G.; Franzini-Armstrong, C. Myology: basic and clinical. Ed. 3, v.2, p.961-1012, 2004.
2. RICOTTI, V.; RIDOUT, D.A.; SCOTT, E.; QUINLIVAN, R.; ROBB, S.A.; MANZUR, A.Y.; MUNTONI, F.; NORTHSTAR, C. N. Long-term benefits and adverse effects of intermittent versus daily glucocorticoids in boys with Duchenne muscular dystrophy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, v. 84, n.6, p.698-705, 2013
3. VALDUGA, A. H.; MIZOBUTI, D. S.; MORAES, F. S. R.; MÂNCIO, R. D.; MORAES, L. H. R.; HERMES, T. A.; MACEDO, A. B.; MINATEL, E. Protection of dystrophic muscle cells using Idebenone correlates with the interplay between calcium, oxidative stress and inflammation. *International journal of experimental pathology*, v.10, n.1, p4-12, 2022.
4. GROUNDS, 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, p. 1 – 19, 2008.
5. DE LUCA, A.; PIERNO, S.; LIANTONIO, A.; CETRONE, M.; CAMERINO, C.; FRAYSSE, B.; MIRABELLA, M.; SERVIDEI, S.; RUEGG, U. T.; CONTE CAMERINO, D. Enhanced dystrophic progression in mdx mice by exercise and beneficial effects of taurine and insulin-like growth factor-1. *J Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 304, n. 1, p. 453 - 63, 2003.
6. Treat-NMD Neuromuscular Network UK, Use of treadmill and wheel exercise for impact on mdx mice phenotype. <http://www.treat-nmd.eu/research/preclinical/SOPs/>, 2014 (accessed 20 september 2021).
7. HYZEWICZ, J.; RUEGG, U. T.; TAKEDA, S. Comparison of Experimental Protocols of Physical Exercise for mdx Mice and Duchenne Muscular Dystrophy Patients. *Journal of neuromuscular diseases*, v. 2, n. 4, p. 325 - 342, 2015.
8. ZELIKOVICH, A. S.; QUATTROCELLI, M.; SALAMONE, I. M.; KUNTZ, N. L.; MCNALLY, E. M. Moderate exercise improves function and increases adiponectin in the mdx mouse model of muscular dystrophy. *Sci. Rep.*, v. 9, n. 1, p. 5770, 2019.