

ASSOCIAÇÃO DE QUERCETINA E BIAPIGENINA (FRAÇÃO LIVRE E ENCAPSULADA) E SEU POTENCIAL EFEITO SOBRE AS CÉLULAS MUSCULARES DISTRÓFICAS

Palavras-Chave: quercetina, biapigenina, camundongo *mdx*, célula muscular distrófica.

Autores(as):

Mauro Donisete Pressato Junior, Instituto de Biologia – UNICAMP

Dr^a Heloina Nathalliê Mariano da Silva (Co-orientadora), Instituto de Biologia - UNICAMP

Prof^a. Dr^a. Elaine Minatel (Orientadora), Instituto de Biologia - UNICAMP

INTRODUÇÃO:

As distrofias musculares são doenças neuromusculares hereditárias que causam degeneração progressiva e irreversível dos músculos, sendo a distrofia muscular de Duchenne (DMD) a forma mais grave e comum¹. Descrita por Guillame Duchenne em 1868, a DMD é causada por uma mutação no gene da distrofina, essencial para a estabilidade das miofibras^{2,3}. A ausência dessa proteína compromete o complexo distrofina-glicoproteínas (CDG), levando a instabilidade no sarcolema, influxo excessivo de cálcio e necrose muscular⁴. Além disso, estresse oxidativo, inflamação e disfunção mitocondrial são fatores críticos na patogênese da DMD⁵.

A doença afeta cerca de 1 em cada 3500-5000 meninos, e embora tratamentos com corticosteróides ofereçam alguns benefícios, eles podem ter efeitos colaterais significativos⁶. Pesquisas com produtos naturais como chá verde, quercetina, resveratrol e curcumina têm mostrado potencial terapêutico, apresentando propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e moduladoras da função mitocondrial em fenótipos distróficos⁶. Neste sentido, levantamos a hipótese que o tratamento com a associação dos flavonóides quercetina e biapigenina possa apresentar potencial efeito sobre as fibras musculares distróficas. Os flavonóides são metabólitos secundários, presentes por exemplo em frutas e vegetais, com múltiplos efeitos benéficos em humanos e animais, incluindo atividades antioxidantes, anti-inflamatórias, antibacterianas, antivirais e antitumorais⁷. A combinação de ambos os antioxidantes (quercetina e biapigenina), com mecanismos de ação diferentes, mas sinérgicos, e resultados antioxidantes previamente relatados tanto na forma livre^{8,9} quanto na forma encapsulada¹⁰ apresentou-se como base essencial para este estudo.

OBJETIVOS:

Este estudo visa investigar o potencial efeito da combinação de quercetina-biapigenina, tanto na forma livre como encapsulada, na regulação dos níveis de cálcio intracelular, do estresse oxidativo e do processo inflamatório em células musculares primárias distróficas de camundongos *mdx*.

METODOLOGIA:

Foram utilizadas culturas primárias de células musculares das linhagens isogênicas C57BL/10-Dmdmdx/PasUnib e C57BL/10ScCr/PasUnib (controle) tratadas com diferentes concentrações de quercetina e biapigenina (25, 12, 6, 3, 1.5, 0.75 e 0.37 µg/mL), tanto na forma livre quanto encapsulada, fornecidas pelo Prof. Dr. Alberto C. P. Dias do CITAB-UM, da Universidade do Minho.

Os ensaios de viabilidade e proliferação celular foram realizados após 24 e 48 horas de tratamento, utilizando os métodos de Vermelho Neutro e MTT para determinar a dose mais eficaz. A quantificação do cálcio intracelular foi realizada com o indicador de fluorescência Fluo-4. A avaliação do estresse oxidativo foi conduzida utilizando o Kit Amplex Red, e o processo inflamatório foi investigado, por meio do protocolo de Western Blotting, através da marcação de TNF.

Os protocolos experimentais seguiram as diretrizes éticas do COBEA e foram aprovados pela CEEA-IB/UNICAMP (nº 6334-1/2023). Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística utilizando ANOVA One Way seguido pelo teste de Tukey, com o objetivo de se obter informações sobre o potencial terapêutico da combinação de quercetina e biapigenina em células musculares distróficas, e como isso afeta o estresse oxidativo e a inflamação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Análise da proliferação e viabilidade celular

Para avaliar a proliferação e a citotoxicidade celular nas formas livres e encapsuladas de Quercetina e Biapigenina foram utilizados os ensaios MTT e Vermelho Neutro avaliados em 24 e 48 horas após o tratamento.

Através do ensaio MTT, não foi observado diferenças significativas na proliferação celular em células musculares C57BL/10 e *mdx*, analisadas 24 horas após o tratamento. No entanto, foram observadas redução significativa nos grupos (DMSO, QBL 25µg/mL, QBL 12µg/mL, QBL 6µg/mL) quando comparados ao grupo *mdx* analisados 48 horas após o tratamento. Foi observado também um aumento significativo nos grupos (QBN 0,75 µg/mL e QBN 0,37µg/mL) quando comparados com o grupo DMSO.

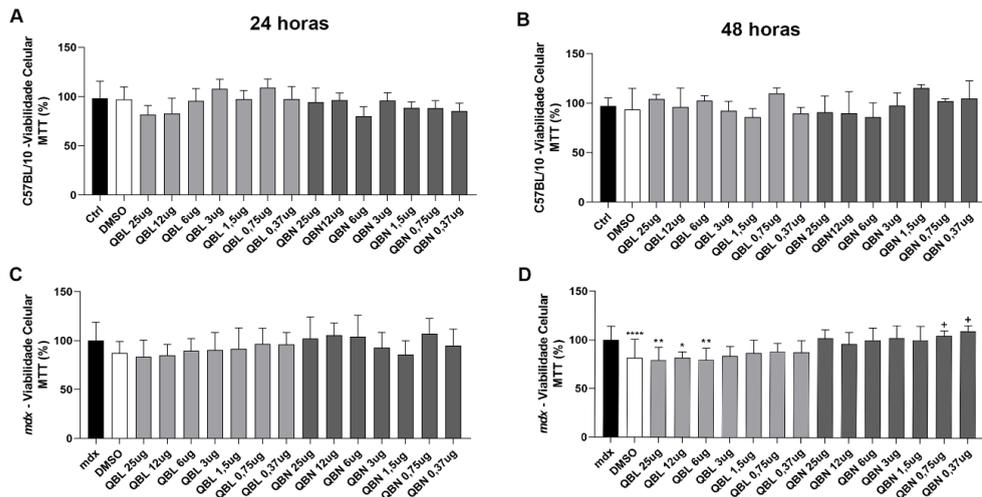


Figura 1: Análise da proliferação celular utilizando o ensaio MTT. Cultura de células musculares controle não tratadas (Ctrl), tratadas com veículo (DMSO), tratadas com a combinação de quercetina e biapigenina, tanto na forma livre (QBL), como encapsulada (QBN), em diferentes concentrações (25, 12, 6, 3, 1,5, 0,75 e 0,37 µg/mL). **A.** 24 horas após o tratamento. **B.** 48 horas após o tratamento. Cultura de células musculares *mdx* não tratadas (*mdx*), tratadas com veículo (DMSO), tratadas com a combinação de quercetina e biapigenina, tanto na forma livre (QBL) como encapsulada (QBN), em diferentes concentrações (25, 12, 6, 3, 1,5, 0,75 e 0,37 µg/mL). **C.** 24 horas após o tratamento. **D.** 48 horas após o tratamento. Os resultados estão expressos como média ± desvio padrão. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. ; *P< 0,05 difere do grupo *mdx*; **P< 0,01 difere do grupo *mdx*; ***P< 0,00001 difere do grupo *mdx*; +P< 0,05 difere do grupo DMSO. One-way ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

Através da análise do ensaio de Vermelho Neutro (Fig. 2, A-D), não foi observada diferença significativa entre os grupos tratados nas células musculares C57BL/10 quando comparadas com o grupo *mdx*. Contudo, foi observado um aumento significativo nos grupos QBN 3µg/mL e QBN 0,75µg/mL em relação ao grupo DMSO na cultura de células musculares *mdx* analisadas 48 horas após o tratamento.

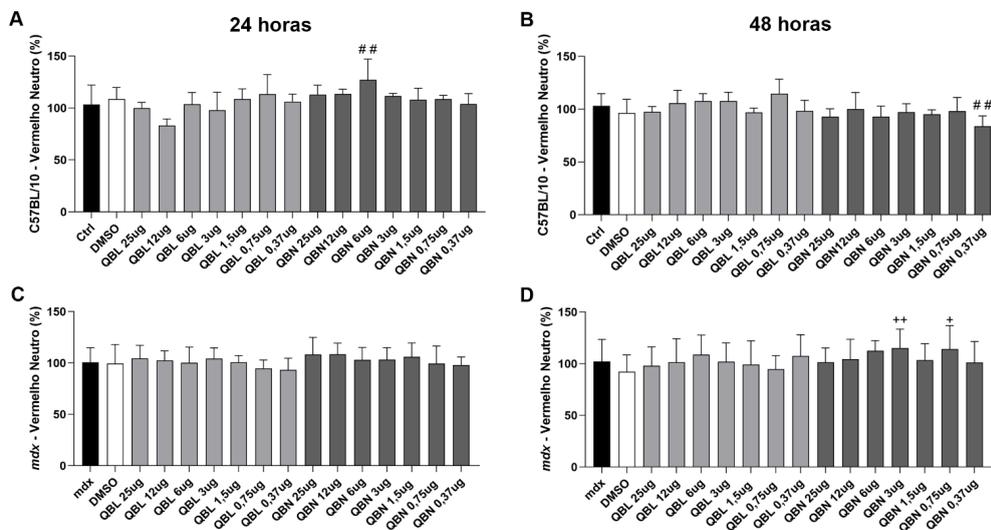


Figura 2: Análise da viabilidade celular por meio do teste Vermelho Neutro. A e B. Cultura de células musculares controle não tratadas (**Ctrl**), tratadas com veículo (**DMSO**), tratadas com a combinação de quercetina e biapigenina, tanto na forma livre (**QBL**) como encapsulada (**QBN**), em diferentes concentrações (25, 12, 6, 3, 1.5, 0.75 e 0.37 µg/mL). **A.** 24 horas após o tratamento. **B.** 48 horas após o tratamento. **C e D.** Análise da viabilidade celular por meio do teste Vermelho Neutro em células musculares *mdx* não tratadas (*mdx*), tratadas com veículo (**DMSO**), tratadas com a combinação de quercetina e biapigenina, tanto na forma livre (**QBL**) como encapsulada (**QBN**), em diferentes concentrações (25, 12, 6, 3, 1.5, 0.75 e 0.37 µg/mL). **C.** 24 horas após o tratamento. **D.** 48 horas após o tratamento. Os resultados estão expressos como média ± desvio padrão. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. +P< 0,05 difere do grupo DMSO; ++P< 0,01 difere do grupo DMSO. One-way ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

Análise da morfologia das células musculares

Observa-se na figura 3 que as células musculares *mdx* se diferenciaram completamente no sexto dia de cultura. Foram realizados os tratamentos neste dia e analisados posteriormente 24 e 48 horas. Observou-se que os tratamentos com a combinação de quercetina e biapigenina, tanto na forma livre como encapsulada não alteraram a morfologia das células musculares esqueléticas, caracterizadas por progressão típica de proliferação para diferenciação e fusão em miotubos espessos e ramificados

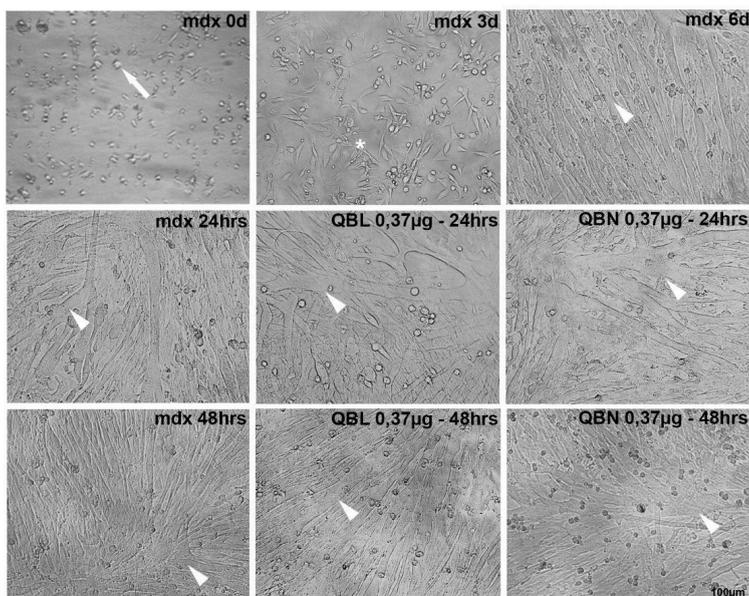


Figura 3: Análise da morfologia das fibras musculares. Morfologia das células musculares *mdx* não tratadas (*mdx*) e células musculares *mdx* tratadas com a forma livre de quercetina+biapigenina (**QBL**) na dose (0,37µg/mL); e com nanopartículas de quercetina+biapigenina (**QBN**) na dose (0,37µg/mL). Analisadas 24 e 48 horas após o tratamento. (**0d**) mostra células musculares indiferenciadas (setas), (**3d**) mostra maturação processo (asterisco) e (**6d**) mostra maturação morfológica completa da célula muscular (ponta de seta).

Análise da concentração de cálcio intramuscular

Para analisar a concentração de $[Ca^{2+}]$ na cultura de células musculares distróficas, foi utilizado o Fluo-4, um indicador de cálcio intracelular que emite fluorescência verde quando ligado ao Ca^{2+} livre no citosol. Observou-se que após 24 horas de tratamento houve uma redução no conteúdo de cálcio em todos os grupos experimentais em relação ao grupo *mdx* e DMSO. Por outro lado, 48 horas após o tratamento foi observado que apenas o grupo QBN 0,37µg/mL apresentou redução significativa de $[Ca^{2+}]$ em comparação com células musculares controle. Já o tratamento com QBL 0,37 µg/mL apresentou aumento significativo comparado com grupo DMSO. E os tratamentos QBN 3µg/mL e 0,37µg/mL apresentaram redução com o grupo DMSO respectivamente (Figura 4 A-D).

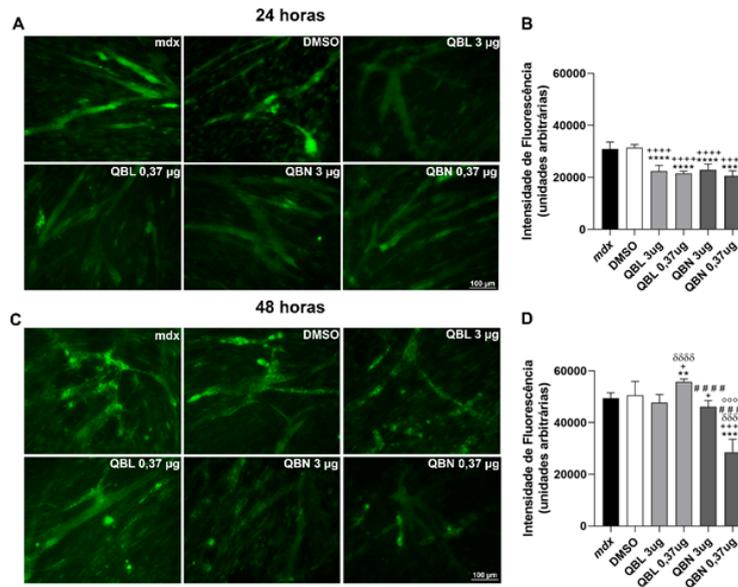


Figura 4. Análise qualitativa e quantitativa das concentrações intracelulares de cálcio [Ca²⁺]. Cultura de células musculares *mdx* não tratadas (*mdx*), tratadas com veículo (DMSO), tratadas com a forma livre de quercetina+biapigenina (QBL) nas doses (3µg/mL e 0,37µg/mL); e com nanopartículas de quercetina+biapigenina (QBN) nas doses (3µg/mL e 0,37µg/mL). **A e B.** 24 horas após o tratamento. **C e D.** 48 horas após o tratamento. **A e C.** Concentração intracelular de Ca²⁺ avaliada pelo marcador de cálcio Fluo-4 (verde). Barra de escala: 100µm, 20x. **B e D.** O gráfico demonstra a intensidade de fluorescência da concentração de Ca²⁺ nos grupos experimentais. Os resultados estão expressos como média ± desvio padrão. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. **P<0,01 difere do grupo *mdx*; ****P<0,00001 difere do grupo *mdx*; + P<0,05 difere do grupo DMSO; ++++P<0,00001 difere do grupo DMSO; #####P<0,00001 difere do grupo QBL 0,37 µg; δδδδP<0,00001 difere do grupo QBL 3 µg; °°°°P<0,00001 difere do grupo QBN 3 µg. One-way ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

Análise do estresse oxidativo

Em relação à concentração de H₂O₂, observou-se que as células musculares *mdx* tratadas após 24 horas com QBN 0,37 apresentou uma redução significativa em comparação com as células do grupo controle. Observa-se também que os grupos tratados com QBL 0,37µg/mL e QBN 0,37µg/mL apresentaram redução significativa em relação DMSO. Após 48 horas de tratamento, observa-se que os grupos tratados QBL 0,37µg/mL e QBN 0,37µg/mL apresentaram redução significativa em comparação ao grupo *mdx*. Por fim, o grupo QBL 0,37µg/mL apresentou redução significativa em relação ao grupo QBL 3µg/mL.

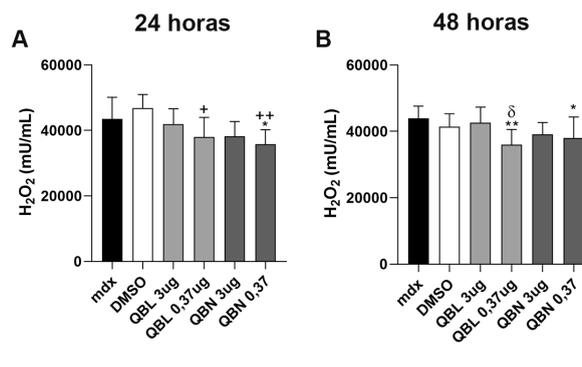


Figura 5: Análise da concentração de H₂O₂. Cultura de células musculares *mdx* não tratadas (*mdx*), tratadas com veículo (DMSO), tratadas com a forma livre de quercetina+biapigenina (QBL) nas doses (3 µg e 0,37µg/mL); e com nanopartículas de quercetina+biapigenina (QBN) nas doses (3 µg e 0,37µg/mL). **A.** 24 horas após o tratamento. **B.** 48 horas após o tratamento. **A e B.** O gráfico demonstra a concentração de H₂O₂. Os resultados estão expressos como média ± desvio padrão. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. *P<0,05 difere do grupo *mdx*; **P<0,01 difere do grupo DMSO; +++P<0,001 difere do grupo DMSO; δδP<0,01 difere do grupo QBL 3 µg. One-way ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

Análise do processo inflamatório

Os níveis de TNF- α foram determinados por *imunoblotting*. Porém não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre os grupos experimentais.

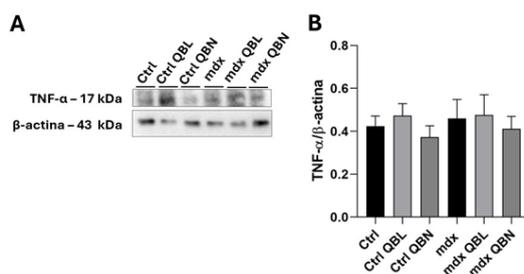


Figura 6: Western Blotting da via inflamatória. A. Análise de Western Blotting de TNF- α : nos grupos controle não tratadas (**Ctrl**), tratadas com a combinação de quercetina e biapigenina, tanto na forma livre (**QBL**) como encapsulada (**QBN**). *mdx* não tratadas (**mdx**), tratadas com a combinação de quercetina e biapigenina, tanto na forma livre (**QBL**) como encapsulada (**QBN**). B. TNF- α . O gráfico mostra os níveis relativos de proteína dos grupos experimentais. Os resultados estão expressos como média \pm desvio padrão. One-way ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

CONCLUSÕES:

Diante do exposto, observa-se que os tratamentos com quercetina e biapigenina tanto na forma livre quanto encapsulada não apresenta efeitos citotóxicos nas linhagens celulares de C57BL/10 e *mdx* nas doses de 3 e 0,37 μ g. Ambas as formas de tratamento contribuíram para a redução do cálcio intracelular e do estresse oxidativo, sugerindo potencial terapêutico para Distrofia Muscular de Duchenne. No entanto, são necessários mais estudos pré-clínicos para compreender seu mecanismo de ação.

BIBLIOGRAFIA

- GOYENVALLE, A.; SETO, J.T.; DAVIES, K.E.; CHAMBERLAIN, J. Therapeutic approaches to muscular dystrophy. *Human Molecular Genetics*, v. 20, n. 1, p. 69-78, abril 2011.
- BOGDANOVICH, S., PERKINS, K. J., KRAG, T. O., KHURANA, T. S. Therapeutics for Duchenne muscular dystrophy: current approaches and future directions. *Journal of molecular medicine*, v. 82, n. 2, p. 102-115, 2004.
- BIRNKRANT, D.J.; BUSHBY, K.; BANN, C.M.; APKON, S.D.; BLACKWEEL, A.; BRUMBAUGH, D.; CASE, L.E.; CLEMENS, P.R.; HADJIYANNAKIS, S.; PANDAY, S.; STREET, N.; TOMEZSKO, J.; WAGNER, K.R.; WARD, L.M.; WEBER, D.R. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and neuromuscular, rehabilitation, endocrine, and gastrointestinal and nutritional management. *The Lancet Neurology*, v. 17, n. 3, p. 251-267, 2018. ISSN 1474-4422.
- BIGGAR, W. D., H. J. KLAMUT, P. C. DEMACIO, D. J. Stevens and P. N. Ray. "Duchenne muscular dystrophy: current knowledge, treatment, and future prospects." *Clin Orthop Relat Res*, n. 401, p. 88-106, 2002.
- TIDBALL, J. G.; WELC, S. S.; WEHLING-HENRICKS, M. Immunobiology of inherited muscular dystrophies. *Comprehensive physiology*, v. 8, n. 4, p. 1313, 2018.
- MENDELL, J.R.; SHILLING, C.; LESLIE, N.D.; FLANIGAN, K.M.; AL-DAHAK, R.; GASTIER-FOSTER, J.; KNEILE, K.; DUNN, D.M.; DUVAL, B.; AOYAGI, A.; HAMIL, C.; MAHMOUND, M.; ROUSH, K.; BIRD, L.; RANKIN, C.; LILLY, H.; STREET, N.; CHANDRASEKAR, R.; WEISS, R.B. Evidence-based path to newborn screening for duchenne muscular dystrophy. *Ann Neurol*, v. 71, p. 304-313, 2012. 12
- MIDDLETON, E.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T. C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev*, v. 52, n. 4, p. 673 -751, 2000. 20
- SILVA, B.A.; OLIVEIRA, P.J.; DIAS, A.; MALVA, J.O. Quercetin, kaempferol and biapigenin from *Hypericum perforatum* are neuroprotective against excitotoxic insults. *Neurotox. Res.*, v. 13, n. 3-4, p. 265-279, 2008. 26
- JNAWALI, H.N.; PARK, Y.; JEON, D.; LEE, E.; KIM, Y. Anti-Inflammatory Activities of Biapigenin Mediated by Actions on p38 MAPK Pathway. *Bull. Korean Chem Soc.*, v. 36, p. 2325-2329, 2015. 29
- OLIVEIRA, A.I.; PINHO, C.; FONTE, P.; SARMENTO, B.; DIAS, A.C.P. Development, characterization, antioxidant and hepatoprotective properties of poly (e-caprolactone) nanoparticles loaded with a neuroprotective fraction of *Hypericum perforatum*. *Int. J. Biol. Macromol*, v. 110, p. 1-12, 2018. 30