

Análise do perfil inflamatório no hipotálamo de fêmeas de um modelo animal de deficiência de ferro para a Síndrome das Pernas Inquietas.

Palavras-Chave: Síndrome das Pernas Inquietas, Inflamação, Deficiência de Ferro.

Autores(as):

Vanderson Rocha, FCA – UNICAMP;

Beatriz Franco, FEF – UNICAMP;

Wenicios Ferreira Chaves, FCA – UNICAMP;

Profª. Drª. Adriana Souza Torsoni, FCA- UNICAMP;

Prof. Dr. Marcio Alberto Torsoni, FCA – UNICAMP

Profª. Drª. Andrea Maculano Esteves (orientadora), FCA - UNICAMP

INTRODUÇÃO:

A Síndrome das Pernas Inquietas (SPI) é caracterizada como um distúrbio sensorio motor e possui uma íntima relação com o sono. Os sintomas são descritos como sensações angustiantes de coceiras entre os joelhos e tornozelos principalmente no período noturno (Garcia-Borreguero et al., 2006; Spolador et al., 2006), combinando esses sintomas com vontade incontrolável de movimentar os membros inferiores (Walters, 1995). O indivíduo diagnosticado consegue sentir alívio dos sintomas após a movimentação das pernas, sintomas estes que apresentam maior intensidade durante a noite (Zucconi et al., 2004).

Como consequência da SPI, o paciente apresenta diminuição da qualidade do sono por conta do aumento da latência do sono e do número de despertares e diminuição da qualidade de vida (Allen et al., 2005; Berger et al., 2004).

A SPI pode ser manifestada através da origem genética (Masuko et al., 2004) e alguns estudos mostram que a SPI também pode ser manifestada através da deficiência de ferro cerebral (Earley et al., 2014). Além disso, pesquisas indicam que há uma prevalência elevada de SPI em pacientes que possuem baixa disponibilidade de ferro sistêmico (Allen et al., 2013; Allen & Earley, 2007). A SPI possui uma estreita relação com a inflamação por conta do prejuízo causado no sono (privação de sono), podendo levar a alterações em citocinas pró-inflamatórias, na glicemia e alterações metabólicas (Yamagishi, 2003; McEwen, 2006; Wang et al., 2010; Davis et al., 2012; Hirotsu et al., 2015). Ainda não está claro o efeito da deficiência de ferro no metabolismo da glicose e na resposta inflamatória, além disso são poucos os estudos que abordam sobre a inflamação central e a deficiência de ferro, além do mais, nenhum aborda o modelo específico da SPI.

OBJETIVO:

Analisar o perfil inflamatório no hipotálamo, sono, comportamento e níveis séricos do sangue de um modelo animal de SPI com deficiência de ferro com camundongos fêmeas.

METODOLOGIA:

Foram utilizados camundongos fêmeas C57 com 28 dias de vida (nº 6013-1/2022), distribuídos em dois grupos: controle (CTRL) e deficiência de ferro (DFe). Aos 28 dias de vida, todos os animais

iniciaram a dieta AIN93-M, no entanto o grupo controle (CTRL) com uma concentração de ferro padrão (40mg/kg) e o grupo deficiência de ferro (DFe) com uma concentração de ferro restrita (<4mg/kg). Foi realizado o hematócrito nos animais após 4 e 8 semanas de dieta para a caracterização do modelo experimental, previamente já descrito na literatura (Lai et al., 2017; Woods et al., 2023). Os níveis de glicose e os testes de tolerância à glicose (GTT) e tolerância à insulina (ITT) foram analisados com 8 semanas de dieta. Nas semanas 4 e 8, os animais foram submetidos ao teste de comportamento de campo aberto (open field) para caracterizar a atividade locomotora. Com 11 semanas de dieta, os animais passaram por uma cirurgia de implantação de eletrodos para a registro e análise do sono. Após 7 dias de recuperação da cirurgia de implantação de eletrodos, foi realizada a polissonografia (registro do sono de 24 horas). Ao término do experimento, com aproximadamente 12 semanas de dieta, os animais foram eutanasiados por aprofundamento anestésico seguido de decapitação (CFMV, 2012) e amostras de tecidos coletadas para as análises de Western Blotting (WB) e PCR foram hipotálamo e para o kit bioquímico foi coletado o soro.

Dieta de ferro - Ambos os grupos receberam dieta AIN93M (Reeves, 1997) desde os 28 dias de vida até o final do experimento, e o mix mineral foi manipulado para a deficiência de ferro (<4mg/kg de ferro).

Hematócrito - Na 4^a e 8^a semana de dieta os níveis de hematócrito foram analisados pelo sangue dos animais (caudal). A coleta foi feita em capilares e foram centrifugadas a 3500 rpm durante 5 minutos. Após a centrifugação, os níveis de hematócritos são calculados mensurando a camada de glóbulos vermelhos em relação ao conteúdo total coletado.

GTT e ITT - Ainda na 8^a de dieta foram realizados a glicose em jejum, e os testes de tolerância à insulina (ITT) e de tolerância à glicose (GTT). Sendo assim, os animais foram submetidos a um jejum de 12h, seguidas por mais 2h de alimentação e outro jejum de 4h para a realização dos testes (Simino et al., 2020). No início de cada teste, foi injetado via intraperitoneal, glicose (no GTT) e insulina (no ITT), sendo 1 g/kg de glicose e 1,5 UI/kg de insulina. O sangue foi coletado via caudal e analisado com tiras e medidor de glicose Accu Chek nos momentos 0, 15, 30, 60, 90, 120 no GTT e nos momentos 0, 5, 10, 15, 30 no ITT.

Open Field - Na 4^a e 8^a semana foi realizado o teste de campo aberto (Open Field) com o objetivo de mensurar a atividade locomotora e comportamental dos animais. A caixa consiste em 60 cm de diâmetro, paredes com 48 cm de altura e parte superior aberta. Cada animal permanece por 10 minutos e apenas os 5 minutos finais são mensurados. Sendo assim, as variáveis analisadas foram: ambulação central, ambulação periférica, ambulação total, rearing e grooming.

Registro do Sono - Após 10 semanas, foi realizada uma cirurgia estereotáxica para implante de um eletrodo capaz de monitorar as atividades cerebrais dos animais com o intuito de analisar o sono e suas respectivas fases (vigília, sono rem e sono de ondas lentas) (para mais detalhes ver Franco et al., 2021). Também foram implantados dois condutores de sinal na pata direita traseira do animal com o objetivo de avaliar o movimento período das patas e a quantidade de eventos. Após 7 dias de recuperação da cirurgia, os animais foram colocados na polissonografia para registro, e analisados os seguintes parâmetros: tempo total de sono, eficiência do sono, número de despertares, número de movimento das patas, sono de ondas lentas, sono REM e vigília.

Western Blotting (WB) - Os tecidos (hipotálamo) foram homogeneizados e preparados seguindo Franco et al., (2021). As amostras foram pipetadas no gel SDS-PAGE e transferidas para uma membrada de nitrocelulose com auxílio do Mini-Gel Bio-rad. As membranas foram incubadas com anticorpos primários específicos (pJNK (sc6254), NFkB (sc372), TLR4 (sc30002), IKK (sc-376114) utilizando como controle endógeno GAPDH. Os anticorpos secundários adequados foram utilizados e a revelação das membranas foi realizada pelo fotodocumentador GeneGnomeXRQ-Syngene (quimioluminescência). A intensidade das bandas foi avaliada por densitometria pelo programa Scion Image (Scion Corporation).

Reação em cadeia da polimerase (PCR) – No hipotálamo, o RNA do tecido foi isolado utilizando Trisol. As etapas detalhadas estão descritas em Franco et al., (2021). A análise da expressão gênica foi analisada usando o Sistema de Detecção de Sequências da empresa Applied Biosystems versão 1.7

Forma de análise dos resultados - Foram utilizados para a análise dos dados o software IBM SPSS. A normalidade do modelo foi analisada através do teste de Shapiro. Para análise do sono, WB e PCR foi utilizado o Test t e os dados referentes ao ITT, GTT, glicemia, peso dos animais e open field foi utilizado o Modelo Misto Linear, com o post hoc Bonferroni quando apropriado. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Os resultados apresentados abaixo pela figura 1 são referentes às análises do kit bioquímico de ferro de ferritina, transferrina e ferro sérico. Apesar da ferritina e ferro sérico não demonstrarem diferenças estatisticamente significativas, houve uma redução significativa ($p=0,0187$) na transferrina do grupo deficiência de ferro em relação ao grupo controle (Fig. 1B).

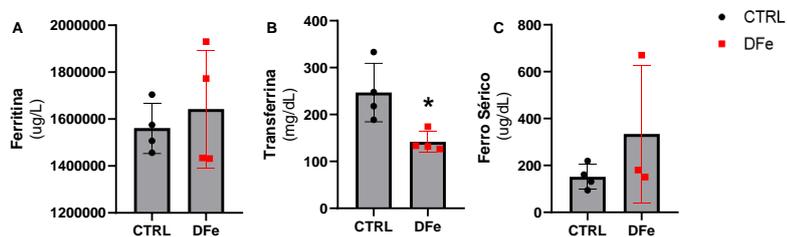


Figura 1. (A) Análise de ferritina, (B) transferrina e (C) ferro sérico no soro. Dados apresentados em valores individuais, médias e desvios-padrão, ($n=4$). Os dados foram analisados pelo test T ($p<0,05$).

Na figura 2, não observamos diferenças significativas para os resultados referentes aos testes de hematócrito, glicemia em jejum, GTT e ITT. O baixo nível de transferrina está intimamente ligado a pouca quantidade de glóbulos vermelhos por conta da baixa disponibilidade de ferro no organismo.

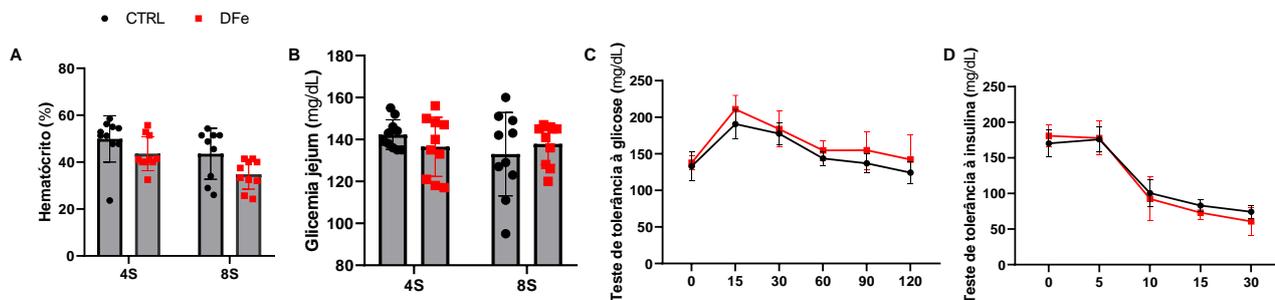


Figura 2. (A) Análise de hematócrito na 4ª semana de dieta AIN93M (4S) na e 8ª semana de dieta AIN93M (8S); (B) Glicose em jejum na 4ª semana de dieta AIN93M (4S) na e 8ª semana de dieta AIN93M (8S); (C) teste de tolerância à glicose (GTT); (D) teste de tolerância à insulina (ITT). Dados apresentados em valores individuais, médias e desvios-padrão ($n=10$). Os dados foram analisados pelo Modelo Misto, com post hoc Bonferroni ($p<0,05$).

Abaixo, na figura 3, estão representados os resultados respetivos ao teste de campo aberto. Não foram observadas diferenças significativas.

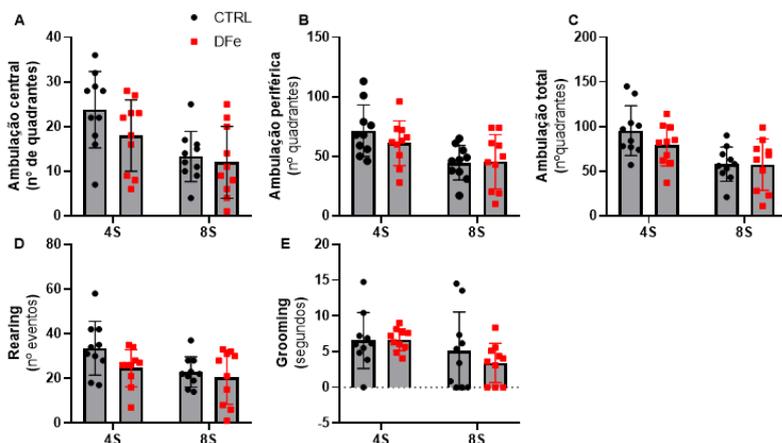


Figura 3. Teste de Open Field realizado na 4ª (4S) na e 8ª semana de dieta AIN93M (8S). Ambulação central (A), Ambulação periférica (B), Ambulação total (C), Rearing (D) e Grooming (E). Dados apresentados em valores individuais, médias e desvio padrão, ($n=12$). Os dados foram analisados pelo Modelo Misto, com post hoc Bonferroni ($p<0,05$).

Na figura 4, podemos observar diferença estatística no sono REM do período claro, com aumento significativo no grupo de deficiência de ferro ($p=0,0396$) quando comparado ao grupo controle (Fig. 4B). O aumento do sono REM nos animais do grupo deficiência de ferro pode ser considerado um rebote por conta de uma possível restrição de sono (Feriante, 2023; Machado et al., 2017) mas nossos resultados não mostraram diferenças significativas entre os grupos no que diz respeito ao tempo de sono dos animais.

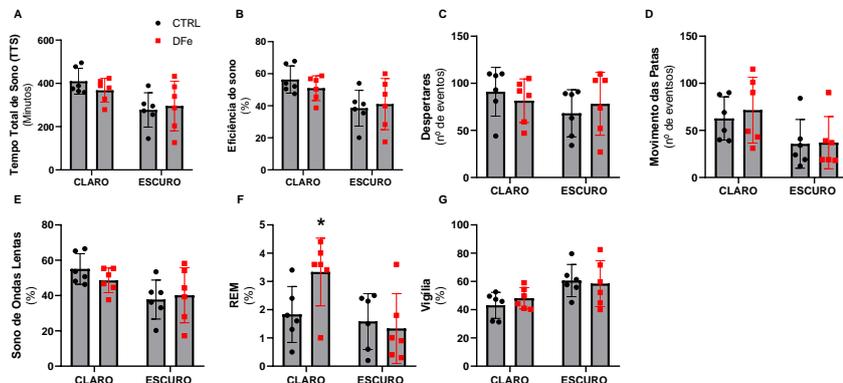


Figura 4. Registro do sono no período de 24h realizado na 11ª semana de dieta. (A) tempo total de sono; (B) eficiência do sono; (C) despertares; (D) movimento das patas; (E) sono de ondas lentas; (F) sono REM; (G) vigília. Dados apresentados em valores individuais, médias e desvios-padrão ($n=6$). Os dados foram analisados pelo test T ($p<0,05$).

Os resultados apresentados abaixo pela figura 5 são referentes ao conteúdo proteico de IKK, TLR4, JNK, AKT e NFKB. Foi observada redução significativa da AKT no grupo deficiência de ferro ($p=0,0112$) em comparação ao controle (Fig. 5D), porém, nas proteínas inflamatórias não foram observadas nenhuma diferença estatística. A redução da AKT pode interferir no sinal insulínico e consequentemente na captação de glicose pela via da insulina (Yan et al., 2018), no entanto nossos resultados de glicemia não mostraram diferenças entre os grupos.

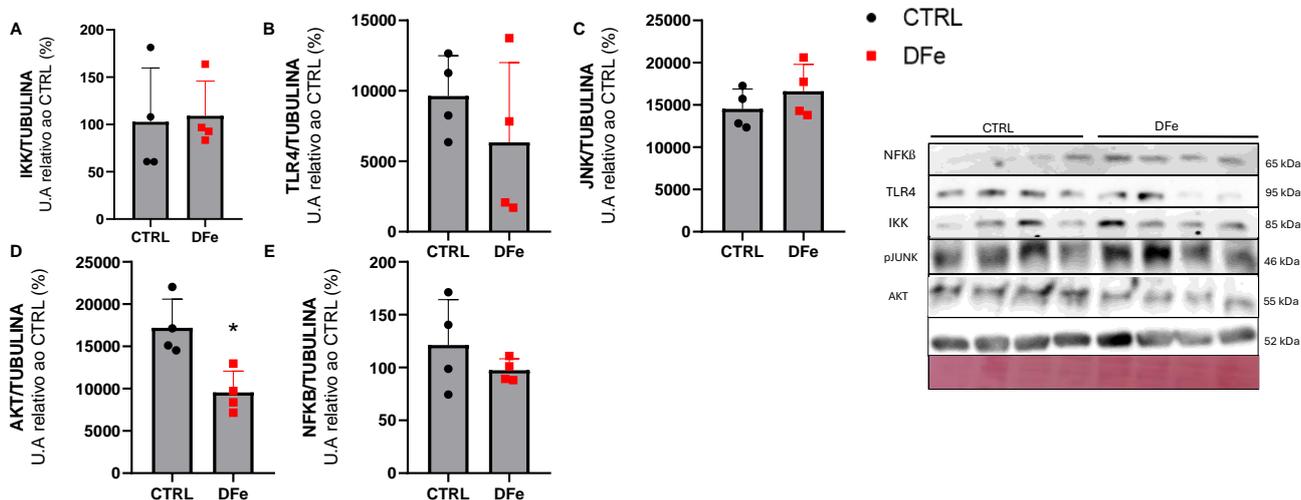


Figura 5. Quantificação do conteúdo proteico (western blotting). (A) IKK/Tubulina; (B) TLR4/Tubulina; (C) JNK/Tubulina; (D) AKT/Tubulina; (E)NFKB-Tubulina. Dados apresentados em valores individuais, médias e desvios-padrão ($n=4$). Os dados foram analisados pelo test T ($p<0,05$).

Nos experimentos relacionados a reação em cadeia da polimerase (figura 6), não foram observados resultados com diferenças significativas.

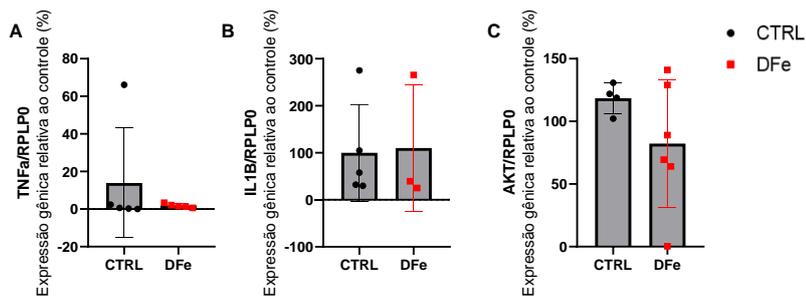


Figura 6. Expressão gênica (PCR). (A) *TNF-α/RPLPO*; (B) *IL1β/RPLPO*; (C) *AKT/RPLPO*. Dados apresentados em valores individuais, médias e desvios-padrão (n=4-6). Os dados foram analisados pelo test T (p<0,05).

CONCLUSÕES:

Foram encontrados resultados de aumento de sono REM, e redução de AKT e transferrina no grupo deficiência de ferro comparado ao controle. Embora tenhamos encontrado diferença em relação a AKT, nosso objetivo era investigar as proteínas inflamatórias como NFKB, TNF- α , IKK e JNK e se poderia haver alteração no hipotálamo, no entanto não foram apresentadas diferenças entre os grupos. No que se refere ao sono, em um estudo anterior realizado pelo nosso grupo, foi demonstrado em camundongos machos com deficiência de ferro para a síndrome das pernas inquietas redução da eficiência do sono, aumento do movimento das patas, diminuição do sono REM, e diminuição do sono de ondas lentas. Os próximos passos estão relacionados a entender essas diferenças entre o modelo de deficiência de ferro para a SPI em camundongos fêmeas e machos.

BIBLIOGRAFIA:

- Allen, R. P., Walters, A. S., Montplaisir, J., Hening, W., Myers, A., Bell, T. J., & Ferini-Strambi, L. 2005. Restless legs syndrome prevalence and impact: REST general population study. *Arch Intern Med*, 165(11): 1286-1292.
- Allen, R. P., Picchietti, D., Hening, W. A., Trenkwalder, C., Walters, A. S., & Montplaisir, J. 2003. Restless legs syndrome: diagnostic criteria, special considerations, and epidemiology. *Sleep Medicine*, 4(2): 101-119.
- Berger, K., Luedemann, J., Trenkwalder, C., John, U., & Kessler, C. 2004. Sex and the risk of restless legs syndrome in the general population. *Arch Intern Med*, 164(2): 196-202.
- Davis M. R., Hester K. K., Shawon K. M., Lucas E. A., Smith B. J., & Clarke S. L. 2012. Comparisons of the iron deficient metabolic response in rats fed either an AIN-76 or AIN-93 based diet. *Nutr Metab*, 9(1): 95. doi: 10.1186/1743-7075-9-95.
- Earley, C. J., Connor, J., Garcia-Borreguero, D., Jenner, P., Winkelmann, J., Zee, P. C., & Allen, R. 2014. Altered brain iron homeostasis and dopaminergic function in Restless Legs Syndrome (Willis-Ekbom Disease). *Sleep Med*, 15(11): 1288-1301.
- Garcia-Borreguero, D., Egatz, R., Winkelmann, J., & Berger, K. 2006. Epidemiology of restless legs syndrome: the current status. *Sleep Med Rev*, 10(3): 153-167.
- Feriant J, Singh S. REM Rebound Effect. 2023 Oct 29. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan-. PMID: 32809548.
- Hirotsu C, Tufik, S., & Andersen M. L. 2015. Interactions between sleep, stress, and metabolism: From physiological to pathological conditions. *Sleep Sci*, 8(3):143-52. doi: 10.1016/j.slsci.2015.09.002. Epub 2015 Sep 28. PMID: 26779321; PMCID: PMC4688585.
- Kurién, B. T., & Scofield, R. H. 2003. Protein blotting: a review. *J Immunol Methods*, 274(1-2): 1-15.
- Lai YY, Cheng YH, Hsieh KC, Nguyen D, Chew KT, Ramanathan L, Siegel JM. Motor hyperactivity of the iron-deficient rat - an animal model of restless legs syndrome. *Mov Disord*. 2017 Dec;32(12):1687-1693. doi: 10.1002/mds.27133.
- Machado RB, Rocha MR, Suchecki D. Prolactina cerebral está envolvida no rebote do sono REM induzido por estresse. *Horm Behav*. 2017 Mar; 89 :38-47.
- Masuko, A. H., do Prado, L. B. F., & do Prado, G. F. 2004. Síndrome das pernas inquietas. *Revista Neurociências*, v. 12, n. 1, p. 18-20.
- McEwen B. S. 2006. Sleep deprivation as a neurobiologic and physiologic stressor: Allostasis and allostatic load. *Metabolism*, 55(10 Suppl 2):S20-3. doi: 10.1016/j.metabol.2006.07.008. PMID: 16979422.
- Montplaisir, J., Boucher, S., Poirier, G., Lavigne, G., Lapierre, O., & Lesperance, P. 1997. Clinical, polysomnographic, and genetic characteristics of restless legs syndrome: a study of 133 patients diagnosed with new standard criteria. *Mov Disord*, 12(1): 61-65.
- Reeves, P. G. 1997. Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A diet. *J Nutr*, 127(5 Suppl): 838S-841S
- Simino LAP, Panzarin C, Torsoni MA, Ignácio-Souza LM, Milanski M, Torsoni AS. Maternal resistance to diet-induced obesity partially protects newborn and post-weaning male mice offspring from metabolic disturbances. *J Dev Orig Health Dis*. 2021 Aug;12(4).
- Spolador, T., Allis, J. C. S., & Pondé, M. P. 2006. Treatment of restless legs syndrome. *Brazilian Journal of Psychiatry*, v. 28, n. 4, p. 308-315.
- Walters, A. S. 1995. Toward a better definition of the restless legs syndrome. The International Restless Legs Syndrome Study Group. *Mov Disord*, 10(5): 634-642.
- Wang D, Malo D, & Hekimi S. 2010. Elevated mitochondrial reactive oxygen species generation affects the immune response via hypoxia-inducible factor-1 α in long-lived *Mcl1*^{+/-} mouse mutants. *J Immunol*, 184(2):582-90. doi: 10.4049/jimmunol.0902352. Epub 2009 Dec 9. PMID: 20007531.
- Woods S, Basco J, Clemens S. Effects of iron-deficient diet on sleep onset and spinal reflexes in a rodent model of Restless Legs Syndrome. *Front Neurol*. 2023 May 18;14:1160028. doi: 10.3389/fneur.2023.
- Yan J, Wang C, Jin Y, Meng Q, Liu Q, Liu Z, Liu K, Sun H. Catalpol ameliorates hepatic insulin resistance in type 2 diabetes through acting on AMPK/NOX4/PI3K/AKT pathway. *Pharmacol Res*. 2018 Apr;130:466-480. doi: 10.1016/j.phrs.2017.12.026. Epub 2017 Dec 25. PMID: 29284152.
- Yamagishi H., & Komabayashia, T. 2003. Alteration of glucose metabolism and increased fructosamine in iron deficiency anemic rats. *Nutr Res*, 23: 1547-1553.
- Zucconi M, & Ferini-Strambi L. 2004. Epidemiology and clinical findings of restless legs syndrome. *Sleep Med*, 5(3):293-9. doi: 10.1016/j.sleep.2004.01.004. PMID: 15165538.