XXV Congresso de Iniciação Científica da Unicamp

18 a 20 Outubro Campinas | Brasil

Tempol: Potencial terapia antioxidante para células musculares distróficas?

Ian F. Rupcic*, Tulio de Almeida Hermes, Elaine Minatel.

Resumo

Os corticosteróides representam a terapia comumente utilizada para o tratamento da Distrofia Muscular de Duchenne (DMD), porém seus efeitos adversos tem incentivado a procura por outras terapias farmacológicas. Visto que diversas evidências sugerem o papel do estresse oxidativo na fisiopatogênese das distrofias musculares, neste trabalho investigamos os efeitos do tempol, um potente antioxidante e mimético da SOD, em células musculares distróficas primárias de camundongos mdx, modelo experimental da DMD.

Palavras-chave:

Camundongo mdx, estresse oxidativo, cultura celular.

Introdução

Atualmente o tratamento mais utilizado no paciente com distrofia muscular de Duchenne (DMD) é a administração de corticosteróides, porém seu uso prolongado produz diversos efeitos colaterais graves. Desta forma, é fundamental a busca por terapias alternativas que minimizem a evolução da doença e melhorem a qualidade de vida dos pacientes distróficos e ao mesmo tempo apresentem menos efeitos colaterais do que os corticosteróides. Uma vez que, o estresse oxidativo vem sendo amplamente investigado como um dos principais fatores envolvidos na fisiopatogênese da DMD¹, levantou-se a hipótese de que a administração do antioxidante Tempol em células musculares distróficas possa apresentar efeito benéfico, reduzindo o estresse oxidativo e consequentemente diminuindo a mionecrose². As culturas celulares musculares primárias foram obtidas com a extração dos músculos esqueléticos dos membros posteriores de camundongos C57BL/10 (controle) e mdx (distróficos). O estudo foi estruturado em três grupos: ctrl (C57BL/10), mdx (células musculares distróficas) e mdxT (células musculares distróficas que receberam tratamento com tempol). Após a realização das culturas celulares foi realizado o tratamento das células e preparado o extrato proteico para posterior análise das enzimas e marcadores relacionados ao estresse oxidativo pelo método de Western blotting (WB). A partir destas culturas também foram realizadas análises de viabilidade celular pelas técnicas de vermelho neutro e quantificação de peróxido de hidrogênio pelo método de Amplex Red.

Resultados e Discussão

Para a definição da dose de tempol mais apropriada para o nosso tratamento, foi necessário realizar um teste de viabilidade celular, através do ensaio do vermelho neutro. Definiu-se três dosagens diferentes (2,5, 5 e 10 mM) e as viabilidades celulares foram respectivamente: 106%, 121% e 129%. Escolheu-se a concentração intermediária de 5mM já que o valor não foi significativamente diferente da dosagem de 10mM e o risco de toxicidade aumenta com o aumento da dosagem. Após a extração e congelamento do extrato, foi realizado o método de Bradford³ para se definir a concentração de proteínas em cada extrato para posterior realização do WB. Os compostos analisados por WB foram: SOD2, Catalase,

GR e 4-HNE. Todos os compostos sofreram reduções significativas no grupo tratado com tempol o que revela que este tratamento foi eficaz em diminuir a presença de espécies reativas de oxigênio no tecido muscular e consequentemente diminuir o estresse oxidativo, constatada pela relação direta ou indireta destes marcadores. As reduções observadas foram de: 28% para a SOD2, 34% para a catalase, 59% para a GR e 47% para o 4-HNE do grupo mdxT em relação ao grupo mdx. Através da sonda Amplex red também se verificou que o tratamento foi eficaz em reduzir, em 28%, a concentração de peróxido de hidrogênio nas células musculares distróficas. Em conjunto, estes dados sugerem que o tempol reduziu o estresse oxidativo nas células musculares distróficas primárias.

Conclusões

Sendo que o estresse oxidativo possui um papel importante na fisiopatogênese da DMD, a administração do tempol se demonstrou efetivamente eficaz na redução dos níveis de EROs nas células musculares distróficas de camundongos mdx. Estes resultados preliminares sugerem que o tempol possa ser utilizado como objeto de estudos para futuras terapias coadjuvantes da DMD.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer ao PIBIC pela concessão da bolsa de Iniciação Científica.

1. Whitehead, N. P.; Yeung, E. W.; Allen, D. G. Muscle damage in mdx (dystrophic) mice: role of calcium and reactive oxygen species. Clin and Exp Pharm and Phys, 2006, 33: 657-662.
2. Ragusa, R.J.; Chow, C.K. Oxidative stress as a potential pathogenic mechanism in an animal model of Duchenne muscular dystrophy. Neuromuscul Disord. 1997;7(6-7):379-86.
3. Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem 72: 248-254.