



Análise do perfil inflamatório no hipotálamo de um modelo animal de deficiência de ferro para a síndrome das pernas inquietas – resultados preliminares.

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

Autores(as):

Vanderson Douglas Rocha, FCA – UNICAMP;

Larissa Moreira Dias, FCA – UNICAMP;

Beatriz Franco, FEF – UNICAMP;

Wenicios Ferreira Chaves, FCA – UNICAMP;

Prof^a. Dr^a. Adriana Souza Torsoni, FCA- UNICAMP;

Prof. Dr. Marcio Alberto Torsoni, FCA – UNICAMP

Prof^a. Dr^a. 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, resultando em aumento da sonolência diurna excessiva (Allen et al., 2003) e, conseqüentemente, diminuição da qualidade de vida (Allen et al., 2005; Berger et al., 2004).

A SPI pode ser manifestada na sua forma primária ou secundária, onde as principais causas da primária está relacionada com a origem genética (Masuko et al., 2004). Quanto a secundária, estudos mostram que ocorre através da deficiência de ferro cerebral (Earley et al., 2014). Entretanto, 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, no entanto nenhum aborda o modelo específico da SPI.

OBJETIVO:

Analisar o perfil inflamatório no hipotálamo de um modelo animal de SPI com deficiência de ferro.

METODOLOGIA:

Foram utilizados camundongos machos C57 com 28 dias de vida, distribuídos em dois grupos: controle (CTRL) e deficiência de ferro (DFe). Durante o estudo os animais foram mantidos em salas climatizadas (média de 23°C) com ciclo claro e escuro constante (12/12h), com livre acesso a ração e água e acondicionados em gaiolas com 3 ou 4 animais.

O experimento teve início aos 28 dias de vida (desmame) dos camundongos. Aos 28 dias de vida, todos os animais iniciaram a dieta AIN93, 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 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. Ao término do experimento, com 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).

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). Os valores apresentados da dieta AIN93M são correspondentes às necessidades do roedor na fase adulta e a dieta foi introduzida logo após o desmame com 28 dias de vida.

Hematócrito

Na 8ª 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 8ª 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.

Western Blotting

Com 12 semanas de dieta os animais foram eutanasiados e o hipotálamo foi coletado. Os tecidos foram homogeneizados com um tampão de extração a 4°C, posteriormente centrifugado a 11000 rpm durante 30 minutos para remover o material insolúvel. Após a centrifugação foi utilizado um reagente de Bradford para determinar a concentração de proteínas da amostra e colocado um tampão de Laemmli. As amostras foram pipetadas no gel SDS-PAGE e transferidas para uma membrana 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. Após o período de incubação, os anticorpos foram removidos. Então, as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário. Após a lavagem, as membranas foram incubadas na solução de revelador Super Signal (Thermo Scientific) e colocadas no fotodocumentador GeneGnomeXRQ-Syngene. O sinal foi detectado por quimioluminescência. A intensidade das bandas foi avaliada por densitometria pelo programa Scion Image (Scion Corporation).

Forma de análise dos resultados

Foram utilizados para a análise dos dados o software IBM SPSS. A normalidade do modelo foi analisada através de um estudo do comportamento dos resíduos (Q-Q plot e teste de Shapiro).

Para análise do hematócrito e glicemia foi utilizado o Test t e os dados referentes ao ITT, GTT e peso dos animais foi utilizado o Modelo Misto Linear, com o post hoc Bonferroni quando apropriado. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

RESULTADOS:

A figura 1 apresenta os resultados referentes ao peso corporal ao longo do experimento, a análise do hematócrito, da glicose em jejum, e dos testes de GTT e ITT (com 8 semanas de dieta).

O peso corporal foi analisado ao longo do experimento de forma semanal e foi encontrada diferença estatística para tempo, com aumento ao longo do experimento (fig1 A).

O grupo deficiência de ferro apresentou redução do hematócrito ($p=0,002$, fig1 B). Nos testes de ITT e GTT, foi encontrado diferença para grupo, com aumento para o grupo deficiência de ferro (GTT $p=0,003$, fig1 D; ITT $p=0,002$ fig1 E).

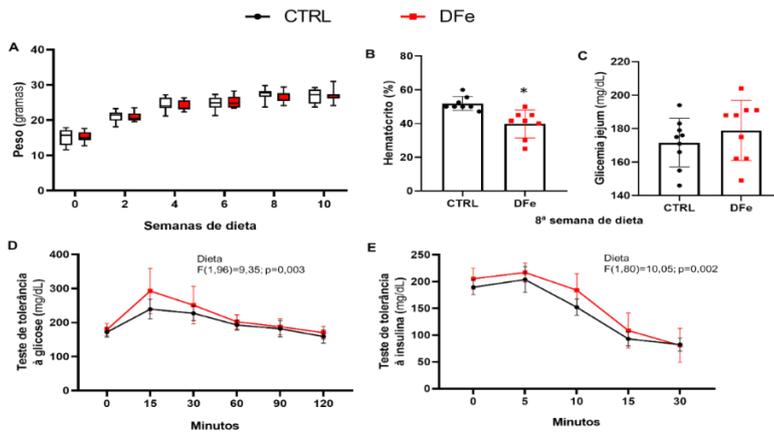


Figura 1. A) Peso ao longo do experimento (g); B) Hematócrito (%); C) Glicemia em jejum; D) Teste de tolerância à glicose (GTT); E) Teste de tolerância à insulina (ITT). Modelo misto linear (A, D e E) e Teste T (B e C) ($p<0,05$).

Na figura 2 são apresentados os resultados referentes ao experimento, no entanto não foram encontradas diferença no hipotálamo levando em consideração o conteúdo proteico de NFKb, TLR4, IKK, pJNK46 e pJNK54 (fig2 A, B, C, D, E e F).

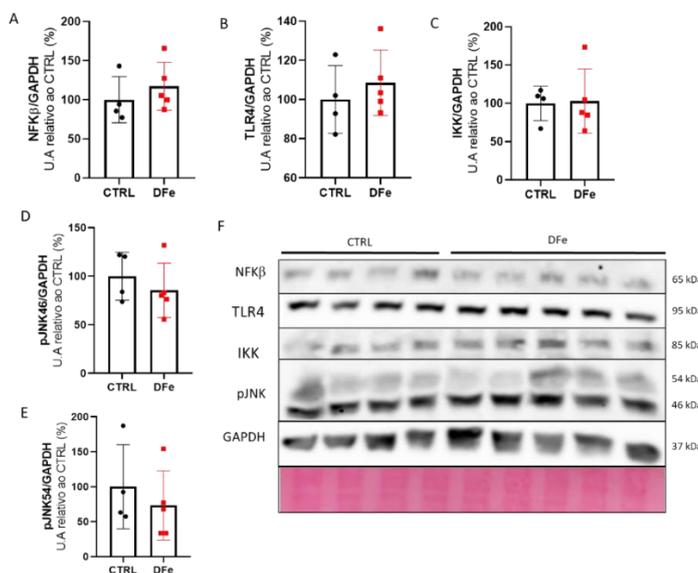


Figura 2. Quantificação do conteúdo proteico (Western Blotting). A) NFKβ ; B) TLR4; C) IKK; D) JNK54; E) JNK46 F) Imagem das bandas. Teste T ($p<0,05$)

CONCLUSÕES:

Foram encontrados comportamentos diferentes nos testes de ITT e GTT entre os grupos, que pode indicar resistência à insulina no grupo DFe. No entanto, até o momento, o nosso modelo animal para a síndrome das pernas inquietas parece não ter grandes prejuízos relacionados a inflamação no hipotálamo pelas proteínas até agora analisadas relacionadas a inflamação.

Apoio financeiro: Fundação de Amparo à Pesquisa (FAPESP)

Processos: 2022/07548-0 e 2020/13074-6.

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., Shawron 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.
- 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.
- Kurien, 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.
- 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-1alpha 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.
- 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.