

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

LAÍS ALICE PIO POMPÊO

VITÓRIA CAMILLY RODRIGUES FERNANDO

**ADMINISTRAÇÃO DE S-EQUOL, UM MODULADOR SELETIVO DO
RECEPTOR DE ESTROGÊNIO BETA (ER-B), EM FIBRAS MUSCULARES DE
CAMUNDONGOS MDX, MODELO MURINO DA DISTROFIA MUSCULAR DE
DUCHENNE**

ALFENAS

2025

LAÍS ALICE PIO POMPÊO
VITÓRIA CAMILLY RODRIGUES FERNANDO

**ADMINISTRAÇÃO DE S-EQUOL, UM MODULADOR SELETIVO DO
RECEPTOR DE ESTROGÊNIO BETA (ER-B), EM FIBRAS MUSCULARES DE
CAMUNDONGOS MDX, MODELO MURINO DA DISTROFIA MUSCULAR DE
DUCHENNE**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
como parte dos requisitos para obtenção do título
de Bacharel em Farmácia, pela
Universidade Federal de Alfenas.
Departamento de Anatomia.
Orientador: Prof. Dr. Túlio de Almeida Hermes.

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central

Pompêo, Lais Alice Pio.

Administração de s-equol, um modulador seletivo do receptor de estrogênio beta ($er-\beta$), em fibras musculares de camundongos mdx, modelo murino da distrofia muscular de Duchenne. / Lais Alice Pio Pompêo, Vitória Camiily Rodrigues. - Alfenas, MG, 2025.

37 f. : il. -

Orientador(a): Túlio de Almeida Hermes.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) -
Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2025.
Bibliografia.

1. Distrofia muscular de Duchenne. 2. Camundongo mdx. 3. SERM. 4. Receptor estrogênico. 5. Mionecrose. I. Rodrigues, Vitória Camiily. II. Hermes, Túlio de Almeida, orient. III. Título.

Ficha gerada automaticamente com dados fornecidos pelo autor.

LAÍS ALICE PIO POMPÊO
VITÓRIA CAMILLY RODRIGUES FERNANDO

**ADMINISTRAÇÃO DE S-EQUOL, UM MODULADOR SELETIVO DO
RECEPTOR DE ESTROGÊNIO BETA (ER-B), EM FIBRAS MUSCULARES DE
CAMUNDONGOS MDX, MODELO MURINO DA DISTROFIA MUSCULAR DE
DUCHENNE**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
como parte dos requisitos para obtenção do título
de Bacharel em Ciências Farmacêuticas, pela
Universidade Federal de Alfenas.

Aprovada em: 10/12/2025

Banca examinadora:

Prof. Túlio de Almeida Hermes (Presidente)
Instituição: Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG:

Profa. Lisandra Brandino de Oliveira
Instituição: Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG:

Profa. Pollyanna Francielli de Oliveira
Instituição: Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG

AGRADECIMENTOS

A Deus, primeiramente, pela oportunidade da vida, pelos caminhos abertos, pelos meios colocados diante de nós e pela resiliência necessária para concluir esta pesquisa. Pela força nos dias difíceis, pela lucidez nos dias importantes e por ter sustentado cada passo até aqui.

Ao nosso orientador, Túlio, pela confiança depositada em nosso trabalho, pela orientação firme e generosa, e pelo apoio constante que deu forma e direção a este projeto. Obrigado por acreditar antes mesmo que estivéssemos prontas.

Aos animais, cuja vida tornou possível cada descoberta deste estudo. A eles, nossa profunda gratidão, pela missão silenciosa e nobre de colaborar com a ciência, por terem sido o coração de tudo isso. Que este trabalho honre cada existência que o tornou possível.

Ao GPBioNM, por ter sido espaço de aprendizado, crescimento e inspiração. À cada colega e pesquisador que compartilhou conhecimento, apoio técnico e entusiasmo científico, deixamos nossa sincera gratidão.

À nossa família, que é alicerce, porto seguro e razão de todas as conquistas. A cada gesto, renúncia e palavra de incentivo, nosso muito obrigado. Em especial às nossas mães, Vilma e Suellen, que com amor, força e coragem nos ensinaram que sonhos são construídos com esforço, ética e coração.

A todas as pessoas essenciais nesta trajetória, que nos ofereceram amor, companheirismo e acolhimento. À Bianca, amiga e parceira de laboratório, pela amizade constante, pelas risadas e pela presença incondicional. E aos nossos parceiros, Francisco e Laís, por serem amor, confiança e cumplicidade, por acreditarem em nós mesmo quando faltou fé própria, por estarem ao nosso lado com paciência, carinho e verdade.

À banca avaliadora, pela disponibilidade, pelo olhar atento e pelas contribuições que fortaleceram e enriqueceram este trabalho.

A cada pessoa que, direta ou indiretamente, deixou sua marca nesta jornada, deixamos nossa gratidão. Este trabalho é fruto de muitas mãos, muitos corações e muita esperança.

Por fim, agradecemos à nossa amizade que nos trouxe até aqui, caminhamos lado a lado desde o início, aprendendo, crescendo e nos sustentando mutuamente. Que este TCC, nosso último projeto juntas na graduação, seja também um marco da força, da confiança e da beleza de tudo o que construímos juntas.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

(Arthur Schopenhauer)

RESUMO

A Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) apresenta um comportamento anormal do cálcio intracelular, que se concentra principalmente nas mitocôndrias. Com isso, ocorre um fenômeno chamada de Transição de Permeabilidade Muscular (TPM) e, simultaneamente, alta produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), promovendo estresse oxidativo, inflamação crônica, indução apoptótica e necrose da fibra muscular. A modulação do receptor estrogênico beta (ER- β), demonstrou inibição da CyoD e regulação da TPM em estudos prévios, o que torna as mitocôndrias resistentes ao influxo de cálcio. Assim, a modulação específica do ER- β apresentou ação benéfica no perfil morfológico e metabólico do músculo distrófico e no padrão de sinalização de suas fibras musculares. Sendo assim, no presente estudo realizou-se a administração de S-equol, um modulador seletivo do ER- β , em células musculares de camundongo mutante distrófico mdx (modelo experimental da DMD). Para o estudo *in vitro* preliminar, foram realizadas culturas primárias de células musculares de camundongos mdx e camundongos saudáveis com 28 dias de vida e foram tratadas por 24 h com 5, 10, 20, 40 e 80 μ M de S-equol. O teste MTT foi realizado para determinar a dose do estudo *in vitro* complementar. A partir do teste MTT observou-se aumento da viabilidade celular nas células distróficas dos camundongos mdx proporcional ao aumento da dose e superior à viabilidade celular apresentada nas células musculares do grupo controle saudável. Em complemento, utilizou-se a dose 40 μ M de S-equol para o tratamento de novas linhagens celulares para a análise de marcadores apoptóticos, miogênicos, antioxidantes e inflamatórios por Western Blotting. A análise dos marcadores mostrou aumento do processo proliferativo e de diferenciação das células musculares, redução do estresse oxidativo e dos processos inflamatórios.

Palavras-chave: Distrofia muscular de Duchenne; camundongo mdx; SERM; receptor estrogênico; mionecrose, estresse oxidativo.

ABSTRACT

Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) presents abnormal intracellular calcium behavior, which is mainly concentrated in the mitochondria. This leads to a phenomenon called Muscle Permeability Transition (MPT) and, simultaneously, high production of reactive oxygen species (ROS), promoting oxidative stress, chronic inflammation, apoptotic induction, and muscle fiber necrosis. Modulation of the estrogen receptor beta (ER- β) has been shown to inhibit CytoD and regulate MPT in previous studies, which makes mitochondria resistant to calcium influx. Thus, specific modulation of ER- β had a beneficial effect on the morphological and metabolic profile of dystrophic muscle and on the signaling pattern of its muscle fibers. Therefore, in the present study, S-equol, a selective ER- β modulator, was administered to muscle cells from mdx dystrophic mutant mice (an experimental model of DMD). For the preliminary in vitro study, primary cultures of muscle cells from mdx mice and healthy mice aged 28 days were treated for 24 h with 5, 10, 20, 40, and 80 μ M of S-equol. The MTT assay was performed to determine the dose for the complementary in vitro study. Therefore, the MTT assay showed an increase in cell viability in dystrophic cells from mdx mice proportional to the increase in dose and higher than the cell viability observed in muscle cells from the healthy control group. In addition, a dose of 40 μ M of S-equol was used to treat new cell lines for the analysis of apoptotic, myogenic, antioxidant, and inflammatory markers by Western blotting. The analysis of the markers showed an increase in the proliferative and differentiation processes of muscle cells, a reduction in oxidative stress and inflammatory processes.

Keywords: Duchenne muscular dystrophy; mdx mouse; SERM; estrogen receptor; myonecrosis; oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Comparação das estruturas de conformação do estradiol, S-(-)equol e R-(+)equol 20
- Figura 2** Proliferação, diferenciação e viabilidade celular de fibras musculares distróficas e saudáveis tratadas com S-equol 27
- Figura 3** Análise dos níveis de MYH3, NF- κ B, MyoD, PARP, catalase e BAX em células musculares distróficas e saudáveis tratadas com S-equol 29

LISTA DE SIGLAS

- AIF - Fator indutor de apoptose
BAX – Regulador apoptótico
C57BL/10 - Camundongo controle
CAT – Catalase
CDG - Complexo distrofina-glicoproteínas
CK - Creatina quinase
COX-2 – Cicloxigenase 2
CypD – Ciclofina D
DMD - Distrofia muscular de Duchenne
ER β – Receptor Estrogênico beta
ERE – Elemento responsivo ao estrógeno
EROs - Espécies reativas de oxigênio
IgG - Imunoglobulina G
I κ B- α – I-kappa-B-alpha
IKK – inibidor do fator de transcrição kappa B
IL-1 β - Interleucina 1 beta
IL-6 - Interleucina 6
LOOH – Peróxido lipídico
MAPKs – Proteínas quinases ativadas por mitógenos
Mdx - Camundongo murine dystrophin
MMPS – Matriz metaloproteinase
NF- κ B - Fator de transcrição nuclear
O₂ - Oxigênio
O²⁻ - Ânion radical superóxido
PBS - Phosphate buffer saline (tampão fosfato salina)
SDS - Sodium dodecyl sulfate
SERMS – Moduladores seletivos dos receptores de estrógeno
SOD – Superóxido dismutase
TBS-T - Tris-Buffered Saline
TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa
TPM – Tensão de Permeabilidade Mitocondria

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 <i>DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE</i>	11
1.2 <i>HIPÓTESE MECÂNICA: RELAÇÃO ENTRE ESTRESSE OXIDATIVO E APOPTOSE</i>	12
1.3 <i>MODELO MURINO DA DMD: A LINHAGEM MDX</i>	14
1.4 <i>INFLUÊNCIA DO SEXO NO FENÓTIPO DA DOENÇA</i>	15
1.5 <i>MODULADORES SELETIVOS DOS RECEPTORES DE ESTROGÊNIO (SERM)</i>	15
1.6 <i>S-EQUOL: DEFINIÇÃO, ORIGEM E ASPECTOS FARMACOLÓGICOS</i>	17
2 JUSTIFICATIVA	19
3 OBJETIVOS	20
3.1 <i>OBJETIVO GERAL</i>	20
3.2 <i>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</i>	20
4 MATERIAIS E MÉTODOS	21
4.1 <i>ANIMAIS</i>	21
4.2 <i>ESTUDO IN VITRO</i>	21
4.3 <i>QUANTIFICAÇÃO DE CATALASE, NF-KB, BCL-2, BAX, MYOD, MYH3, PARP POR WESTERN BLOTTING</i>	21
5 RESULTADOS	25
5.1 <i>EFEITO DOSE-DEPENDENTE DO S-EQUOL NA PROLIFERAÇÃO, DIFERENCIAÇÃO E VIABILIDADE CELULAR DE FIBRAS MUSCULARES SAUDÁVEIS E DISTRÓFICAS</i>	25
5.2 <i>EFEITO DO S-EQUOL NA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS RELACIONADAS À INFLAMAÇÃO, ESTRESSE OXIDATIVO, REGENERAÇÃO E APOPTOSE EM CÉLULAS MUSCULARES SAUDÁVEIS E DISTRÓFICAS</i>	26
6 DISCUSSÃO	29
7 CONCLUSÃO	32
8 REFERÊNCIAS	33
9 ANEXOS	36

1. INTRODUÇÃO

1.1. DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE

A distrofia muscular de Duchenne (DMD) é a mais comum e devastadora dentre todas as distrofinopatias humanas. É uma doença recessiva caracterizada por degeneração progressiva e irreversível da musculatura estriada esquelética (Schmalbruch 1982, Duan, Goemans et al. 2021). A maioria das crianças perde a capacidade de deambular no início da segunda década de vida, culminando com a insuficiência cardiorrespiratória entre 20 e 30 anos (Moxley, Pandya et al. 2010). Por ser ligado ao cromossomo X, é mais frequentemente manifestada no sexo masculino, afetando aproximadamente 1 em cada 3500-6000 nascidos vivos (Duan, Goemans et al. 2021). Em mulheres existem poucos dados populacionais em relação a prevalência da DMD, uma vez que na grande maioria se apresenta forma assintomáticas. Porém, a mulher portadora da mutação pode ser afetada pela DMD como resultado de mudanças no padrão da inativação ou translocação do cromossomo X (Jacobs, Hunt et al. 1981, Hoffman, Pegoraro et al. 1996, Bushby, Finkel et al. 2010).

As anormalidades como as causas da DMD são detectadas no braço curto do cromossomo X (locus Xp21), responsável pela expressão de uma proteína composta por 3685 aminoácidos que integra o sarcolema da fibra muscular denominada distrofina (Yiu and Kornberg 2015). A distrofina (427 kDa) apresenta seu domínio carboxila terminal ligado à proteína transmembrana β -dystroglicana, e seu domínio amina terminal ligado à F-actina citoplasmática (Ohlendieck and Campbell 1991). Com isso, ela se torna um importante componente do complexo distrofina-glicoproteínas (CDG), conectando o interior do citoesqueleto com a matriz extracelular, conferindo organização e estabilidade às células musculares para resistirem às tensões de cisalhamento mecânico que ocorrem durante os ciclos de contração e relaxamento muscular (Bogdanovich, Perkins et al. 2004).

Na DMD, a ausência da distrofina, provoca um desequilíbrio no CDG por interromper a ligação do citoesqueleto com a matriz extracelular, gerando uma instabilidade no sarcolema durante a contração muscular. Dessa forma, ocorre alteração da homeostase intracelular de íons cálcio (Ca^{2+}), hipercontração miofibrilar, ativação de proteases endógenas e necrose da fibra muscular (Biggar, Klamut et al. 2002, Bogdanovich, Perkins et al. 2004).

1.2. HIPÓTESE MECÂNICA: RELAÇÃO ENTRE ESTRESSE OXIDATIVO E APOPTOSE

Algumas hipóteses procuram explicar os mecanismos que levam à degeneração muscular nos músculos distróficos, dentre estas podemos destacar a hipótese mecânica, a qual sugere que os músculos se tornem susceptíveis à lesão durante os ciclos de contração e relaxamento devido a deficiência de ligação entre os meios intracelular e extracelular pela ausência da distrofina. Em virtude desta fragilidade, ocorrem áreas de descontinuidade do sarcolema permitindo a passagem de substâncias do meio intracelular para o meio extracelular, como a enzima creatinoquinase (CK) e do meio extracelular para o meio intracelular, como o Ca^{2+} (Mokri and Engel 1975). O acúmulo intracelular de Ca^{2+} resulta na captação anormal deste pela mitocôndria, ocasionando aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Brookes, Yoon et al. 2004). A forma reduzida do oxigênio molecular, o ânion superóxido (O_2^-) é a primeira classe das EROs produzida, formado a partir da transferência incompleta de elétrons do complexo I e III da cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria (Trachootham, Lu et al. 2008). Por não atravessar facilmente as membranas celulares, normalmente permanece confinada na matriz mitocondrial (Evans 2000). No entanto, o O_2^- pode sofrer dismutação espontânea ou por ação da enzimática da enzima Superóxido dismutase (SOD), levando a formação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que ao contrário do O_2^- , possui a capacidade de atravessar facilmente as membranas biológicas (Fridovich 1995, Bolic, Mijuskovic et al. 2015). O H_2O_2 formado, é também potencialmente perigoso, pois a partir da oxidação de metais de transição que se encontram livremente disponíveis na célula, como o ferro (Fe^{2+}), pode produzir o radical hidroxila (OH^\cdot) (Reação de Fenton) (Barreiros and David 2006).

O OH^\cdot causa danos ao DNA, RNA, às proteínas, lipídios e membranas celulares do núcleo e mitocondrial. No DNA ele afeta tanto as bases nitrogenadas quanto a desoxirribose. O ataque ao açúcar pode ser realizado por abstração de um dos átomos de hidrogênio e quase sempre leva à ruptura da cadeia de DNA e quando produzido perto de uma membrana, os lipídeos podem ser oxidados por ele e iniciar uma reação em cadeia com radicais livres que danificam a membrana gerando no final um peróxido lipídico (LOOH). Um dos perigos da peroxidação lipídica além do dano à membrana é a produção de subprodutos, tais como 4hidroxi-2-nonenal (4-HNE) (Barreiros and David 2006, Forman, Zhang et al. 2009).

A produção de EROs como parte integrante do metabolismo humano é normalmente controlada por um eficiente sistema antioxidante composto por enzimas (Superóxido

Dismutase, SOD; Catalase, CAT e Glutathione Peroxidase, GPx) e substâncias protetoras não enzimáticas (inclui especialmente compostos de origem dietética, dentre os quais se destacam as vitaminas, minerais e compostos fenólicos), algumas atuam reduzindo a velocidade de iniciação dos processos radicalares, suprimindo a geração de radicais livres, ou eliminando-os (de Zwart, Meerman et al. 1999). No entanto, em condições de exaustão como observado na DMD, é criado um estado de estresse oxidativo, levando a danos no sistema biológico (Sies 2015).

Associado à este processo a resposta inflamatória, algo bastante pronunciado na DMD, vem sendo considerado um mecanismo de ordem secundária que contribui para a progressão da doença (Hodgetts, Radley et al. 2006), dando lugar ao estresse oxidativo, como um dos eventos iniciais e desencadeadores da mionecrose (Whitehead, Yeung et al. 2006). Estudos demonstram aumento expressivo de indicadores oxidativos antes mesmo dos 2 anos de idade em pacientes distróficos e das 4 semanas de idade em camundongos mdx (Nakae, Stoward et al. 2004).

As EROs em altas concentrações ativam a enzima IKB-kinase (IKK), que induz a ativação do NF- κ B a partir fosforilação da sua proteína inibitória (IKB- α) (Ogihara, Asano et al. 2004). Desta forma o NF- κ B se transloca para o núcleo ativando processos de transcrição de diversos genes relacionados à inflamação como citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6, TNF- α), moléculas de adesão, matriz metaloproteinase (MMPs), ciclo-oxigenase-2 (COX-2) e óxido nítrico sintase induzível (i-NOS) (Tak and Firestein 2001). Evidências indicam também o envolvimento das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) na patogênese da inflamação; particularmente no animal distrófico observa-se uma up-regulação dessas proteínas (Nakamura, Yoshida et al. 2005). Embora as MAPKs possam regular o próprio NF- κ B (Kyriakis and Avruch 2001), estas proteínas, especificamente a p38, são ativadas diretamente pela produção das EROs (Jia, Wei et al. 2007) regulando a produção de citocinas (Lee, Prabhakar et al. 1994).

As EROs podem causar alterações nas próprias mitocôndrias alterando a conformação de suas membranas (Sestili, Barbieri et al. 2009) permitindo a liberação de proteínas reguladoras de morte por apoptose, bem como os fatores de transcrição necessários para a expressão dos genes pró e anti-apoptóticos (Primeau, Adhietty et al. 2002, Ji 2007). As principais proteínas reguladas por esses genes são as indutoras e repressoras da apoptose da família Bcl-2 (Adams and Cory 2018). Certas proteínas pró-apoptóticas, como a Bax, alcançam sítios de ligação na membrana mitocondrial se associando aos canais iônicos voltagem dependentes e outras

proteínas como a ciclofilina D (CypD), uma proteína de matriz que ao se ligar ao Ca^{2+} se transloca para a membrana interna da mitocôndria (Bernardi, Broekemeier et al. 1994, Connern and Halestrap 1994). A combinação destes elementos contribui para abertura de um megaporo nas membranas interna e externa da mitocôndria denominado, Transição de Permeabilidade Mitochondrial (TPM), o que diretamente prejudica a seletividade da mitocôndria, colaborando com a exacerbação mitocondrial de Ca^{2+} e com a liberação do citocromo c para o citoplasma, principal indutor da cascata apoptótica a partir da ativação das caspases-9 e -3 pelo complexo apoptossomo (Baines, Kaiser et al. 2005, Koushi, Aoyama et al. 2020).

1.3. MODELO MURINO DA DMD: A LINHAGEM MDX

O estudo e compreensão destes e demais eventos biológicos ocorridos na DMD tiveram grande avanço com o aparecimento de linhagem de camundongos mdx (X chromosome-linked muscular dystrophy) (Bulfield, Siller et al. 1984, Manning and O'Malley 2015). Estudos genéticos demonstraram que nos camundongos mdx, o gene afetado é homólogo ao dos pacientes com DMD, apresentando também ausência de distrofina, tornando-o um valioso modelo para estudos da DMD. O camundongo mdx é o modelo animal preferido da DMD devido à larga disponibilidade e baixo custo de produção e manutenção (Manning and O'Malley 2015). Embora o camundongo mdx apresente intenso infiltrado inflamatório nas áreas de mionecrose, difere da distrofia humana por não apresentar fibrose intensa e depósito de tecido adiposo na maioria dos tecidos musculares esqueléticos e os músculos do mdx regeneram sucessivamente após necrose, pelo menos durante a fase adulta do animal (Evans, Misyak et al. 2009). Estudos mostraram que no período entre 21 e 28 dias de vida pós-natal, observa-se extensa área de necrose no músculo tibial anterior destes animais (Shavlakadze, White et al. 2004). A intensa necrose miofibrilar, observada neste período, providencia um excelente modelo para o estudo de intervenções terapêuticas designadas para prevenir ou reduzir a necrose, uma vez que a redução da miopatia é facilmente identificada (Radley and Grounds 2006). Entre 35 e 90 dias a necrose atinge seu ápice, comprometendo um grande número de fibras. Neste período encontram-se mais de 50% das fibras do músculo em regeneração, com diâmetro variável e centronucleação. Com cerca de 120 dias de idade, praticamente todas as fibras do músculo encontram-se regeneradas (Tanabe, Esaki et al. 1986).

1.4. INFLUÊNCIA DO SEXO NO FENÓTIPO DA DOENÇA

Estudos com camundongos mdx machos e fêmeas sugerem diferenças entre os sexos principalmente em relação ao metabolismo energético, composição do tipo de fibra e velocidade contrátil (Grounds, Radley et al. 2008). Geralmente, os músculos de machos tendem a ser mais rápidos e com maior potência que o das fêmeas, enquanto os músculos das fêmeas são mais resistentes à fadiga, recuperam-se mais rapidamente das contrações repetidas e apresentam menos danos mecânicos após o exercício (Glenmark, Nilsson et al. 2004). Estas diferenças são em grande parte atribuídas aos níveis de estrógeno presentes nas fêmeas (Grounds, Radley et al. 2008). Estudos suportam esta hipótese, demonstrando que hormônios femininos como estrógeno pode promover regeneração muscular em lesões musculares esqueléticas tanto em camundongos normais como em mdx (Tiidus 2001, Tiidus, Holden et al. 2001). Recentemente, foi demonstrado atenuação de marcadores estruturais e bioquímicos no tecido muscular distrófico de camundongos mdx fêmeas em relação aos machos em resposta ao exercício físico (Hermes, Kido et al. 2018).

Esta influência ocorre a partir da interação do hormônio com seus receptores específicos, alpha (ER- α) e beta (ER- β), que atuam como fatores de transcrição através de uma sequência específica do DNA denominada elemento responsivo ao estrogênio (ERE) (Klinge 2001, Klinge, Jernigan et al. 2004). Estudos demonstraram a expressão destes receptores no músculo estriado esquelético (Kalbe, Mau et al. 2007, Hermes, Kido et al. 2018). O estrogênio, portanto, a partir da interação com seus receptores parece exercer ação benéfica nas distrofínicas. Reforçando esta hipótese, experimentos com cães distróficos já demonstraram que as fêmeas apresentam uma distrofia mais branda em relação aos machos (Valentine et al., 1988).

1.5. MODULADORES SELETIVOS DOS RECEPTORES DE ESTROGÊNIO (SERM)

Os chamados Moduladores Seletivos dos Receptores de Estrogênio (Selective Estrogen Receptor Modulators - SERM), possuem a capacidade de se ligar aos ERs e ativar os ERE localizados na região promotora dos genes alvo de estrogênio, iniciando o processo de transcrição e síntese de RNAm (Diez-Perez 2006). Dentre os tipos de SERMs existentes, a administração de Tamoxifeno em camundongos mdx demonstrou efeito benéfico sobre o tecido muscular esquelético e cardíaco, melhorando as propriedades contráteis do músculo

esquelético, favorecendo a regeneração e reduzindo a CK sérica e a fibrose ventricular (Dorchies, Reutenauer-Patte et al. 2013). Apesar destes serem resultados promissores, explicações sobre a prevenção da mionecrose e a modulação das respostas inflamatórias são inconclusivos. Outro ponto importante sobre a ação do Tamoxifeno é que na dependência do tecido alvo, pode apresentar respostas opostas. Estimula a proliferação celular no endométrio, apresentando, portanto, uma ação agonista ao estrogênio (Katzenellenbogen, Choi et al. 2000), assim como no tecido ósseo, induzindo efeitos positivos na osteoporose (Singh, Martin-Hirsch et al. 2008), em contrapartida, no tecido mamário, ele age como antagonista, ligando-se aos ER das células cancerígenas inibindo sua proliferação (Sengupta and Jordan 2008). Acreditamos que este efeito possa estar associado a modulação específica de cada ER e suas especificidades funcionais. O ER- β desempenha papéis importantes na fisiologia de diversos tecidos, além de ser o receptor de estrogênio geralmente mais expresso, enquanto ER- α domina em poucos tecidos específicos estando principalmente envolvido em eventos proliferativos (Gustafsson, Puntschart et al. 1999, Bhat-Nakshatri, Wang et al. 2008). No tecido muscular esquelético os ER- α e ER- β são co-expressos no núcleo da célula, mas também se encontram relacionados às células endoteliais dos capilares sanguíneos (Wiik, Ekman et al. 2009). No camundongo mdx, já foi demonstrado aumento da expressão destes receptores em comparação à camundongos saudáveis (Feder, Rodrigues Barros Godoy et al. 2013).

Assim como os SERMs sintéticos, as isoflavonas, encontradas em grandes quantidades em grãos ou subprodutos da soja, são compostos naturais da família dos flavonoides com propriedades de interação e modulação dos ERs, desempenhando ação mimética ao estrógeno, por esta razão são denominadas de fitoestrógenos ou fitoSERMs (Hernandez, Zhao et al. 2018). As formas predominantes de isoflavonas na soja são as formas glicosadas, genisteína e daidzeína (Setchell 2017). A daidzeína, na presença de bactérias intestinais, é transformada em Sequol [7-hidroxi-3-(4'-hidroxifenil) -cromano] (Setchell, Brown et al. 2002), um metabólito com estruturação estrogênica não-esteroidal, com altíssima afinidade de ligação ao ER- β (Setchell, Clerici et al. 2005). Em comparação, estas duas isoflavonas, genisteína e daidzeína, desempenham efeitos similares a partir da seletividade com o ER- β , porém o S-equol apresenta um perfil farmacocinético mais estabelecido (Setchell, Zhao et al. 2009). Em adição, estudos demonstram maior atividade antioxidante do S-equol em comparação as demais isoflavonas (Choi 2009).

Recentemente, Burstain et al. (2018) demonstraram que a modulação específica do ER β regulou a Transição de Permeabilidade Mitocondrial de neurônios pela inativação da enzima CypD (Burstain, Kim et al. 2018). Em camundongos mdx, colaborando com estes estudos, foi demonstrado que a deleção do gene que codifica a CypD (*Ppif*) tornou as mitocôndrias resistentes ao influxo exacerbado intracelular de Ca²⁺, reduzindo assim a mionecrose (Millay, Sargent et al. 2008).

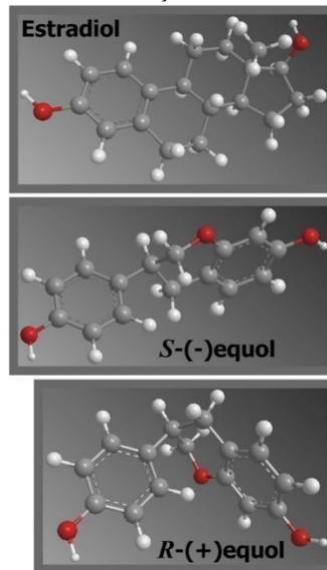
Com base no exposto, acreditamos que a modulação seletiva do ER- β pela administração de S-equol, possa desempenhar ação benéfica no perfil morfológico e metabólico do tecido muscular distrófico de camundongos mdx e no padrão de sinalização de fibras musculares distróficas humanas.

1.6. S-EQUOL: DEFINIÇÃO, ORIGEM E ASPECTOS FARMACOLÓGICOS

O Equol (C₁₅H₁₄O₃) foi isolado pela primeira vez da urina de éguas em 1932 e identificado 50 anos mais tarde na urina humana como um metabólito das isoflavonas da soja em apenas uma parcela dos humanos adultos, denominados “produtores de equol” (SETCHELL; CLERICI, 2010a). A presença ou ausência dessa microbiota funcional determina a capacidade individual de produzir o composto, característica observada em 25-30% da população ocidental e 50-60% da população asiática. A partir disso, surgiram inúmeras hipóteses do benefício de compostos derivados da soja em produtores de equol, o que direcionou ao surgimento de alternativas terapêuticas associadas à afinidade seletiva do S-equol ao receptor de estrogênio β (ER β).

O S-equol é um composto fenólico não esteroide com estrutura similar à do estradiol, formado a partir do metabolismo intestinal das isoflavonas da soja a partir de ação bacteriana (WANG et al., 2005). Sua formação ocorre a partir da redução da daidzeína para dihidrodaidzeína (DHD) que é conseqüentemente convertida no enantiômero S-equol por bactérias anaeróbicas intestinais específicas. O composto possui um centro quiral no carbono 3 que origina dois enantiômeros, sendo o S-equol o alvo deste estudo e interesse farmacológico. Wang et al. ressaltam que a formação do enantiômero S-equol é fundamental para a sua atividade biológica, visto que o R-equol não apresenta afinidade significativa por receptores hormonais. Essa característica justifica a necessidade do uso de bactérias Gram-positivas específicas e enantiosseletivas.

Figura 1 - Comparação das estruturas de conformação do estradiol, S-(-)equol e R(+)-equol



Fonte: (Setchell; Clerici, 2010b)

O S-equol é um composto estável de natureza lipofílica e de baixo peso molecular, favorecendo sua absorção passiva através da mucosa intestinal (WANG et al.). Estudos farmacocinéticos em modelos animais e humanos indicam rápida absorção oral, com tempo de pico plasmático (T_{max}) de 1-3 horas e meia vida (t_{1/2}) de 7-8 horas. Sua biodisponibilidade para ligação aos receptores é superior ao estradiol livre (5%) e à daidzeína (18,7%), sendo 49,7% do equol circulante livre, o que proporciona atividade biológica potencializada devido à sua menor ligação às proteínas séricas (SETCHELL; CLERICI, 2010a).

O composto do estudo possui atividade estrogênica seletiva, atuando como agonista preferencial dos receptores de estrogênio β (ER β), com afinidade significativamente superior em comparação ao subtipo α (ER α). Essa seletividade é responsável por seus efeitos moduladores do sistema hormonal, além de apresentar propriedades antioxidantes e de neutralização de espécies reativas de oxigênio (EROs), o que confere função de proteção celular contra o estresse oxidativo (WANG et al., 2005).

2. JUSTIFICATIVA

Por ser considerada a forma mais grave e comum dentre todas as distrofinopatias, a DMD é foco de diversos estudos que buscam encontrar potenciais terapias para o seu tratamento. Apesar dos avanços científicos nas áreas de terapia genética e celular, até o momento ainda não há um tratamento efetivo para esta doença. Glicocorticoides sintéticos vem sendo vastamente investigado e aceito como tratamento para a DMD por apresentar excelentes resultados na melhora da condição danosa destes pacientes (Herbelet, De Paepe et al. 2020). Porém estes medicamentos podem apresentar efeitos adversos como, ganho de peso, desenvolvimento de catarata e glaucoma, retardo no desenvolvimento ósseo e surgimento de osteoporose, decorrente da perda de osso trabecular, e alterações no metabolismo da glicose, com indução ou agravamento de quadro de diabetes, quando administrados por um longo período (Ricotti, Ridout et al. 2013). Além destas constatações, a disponibilidade de receptores glicocorticóides no músculo esquelético é extremamente baixa, quando comparada aos receptores estrogênicos (Feder, Rodrigues Barros Godoy et al. 2013). Os SERMs já demonstraram efeito benéfico sobre o tecido muscular distrófico (Dorchies, Reutenauer-Patte et al. 2013), porém algumas explicações são inconclusivas, possivelmente pelas diferentes respostas na interação com todos os tipos de ERs. A modulação específica do ER- β melhora o influxo exacerbado de Ca^{2+} pela regulação do poro de Transição de Permeabilidade Mitocondrial inativação da enzima CypD (Burstein, Kim et al. 2018). A inativação da expressão de CypD em camundongos mdx, tornou as mitocôndrias resistentes ao influxo exacerbado intracelular de Ca^{2+} , reduzindo assim a mionecrose (Millay, Sargent et al. 2008). Portanto a utilização do S-equol (produto da daidzeína), um SERM de origem natural, tanto nos camundongos mdx quanto em fibras distróficas humanas, se faz promissora pela maior seletividade de ação com a modulação específica do ER- β .

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Investigar os efeitos do S-equol, como um modulador seletivo do ER- β , sobre as fibras musculares distróficas de camundongos mdx.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar o efeito dose-dependente do tratamento com S-equol in vitro na viabilidade (teste MTT) de fibras musculares primárias de camundongos mdx;
- Análise do marcador apoptótico Bax e PARP;
- Análise do marcador antioxidante: catalase (peroxidação lipídica);
- Análise do marcador inflamatório: NF- κ B;
- Análise do marcador miogênico MyoD e MYH3.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. ANIMAIS

Serão utilizados camundongos das linhagens mdx e C57BL/10 (camundongos heterozigotos para o gene que desencadeia a DMD e que deram origem à linhagem mdx) (Bulfield, Siller et al. 1984), machos, com 4 semanas de vida pós-natal, obtidos de casais mantidos no biotério Central da Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL-MG. O número de animais estipulados está de acordo com as recomendações descritas por Collins e Morgan, 2003; Perrin, 2014 e Denayer et al., 2014 sobre o uso do modelo mdx em estudos experimentais (Collins and Morgan 2003, Perrin 2014). As matrizes serão oriundas do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da UNICAMP. Após o nascimento, os filhotes permanecerão com a fêmea até o desmame. Durante todo o experimento, os animais serão mantidos em caixas plásticas com 12 horas de ciclo claro/escuro, ração Nuvilab CR-1 e água ad libitum. Os protocolos experimentais serão desenvolvidos de acordo com os princípios éticos na experimentação animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e será desenvolvido após ser aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNIFAL-MG.

4.2. ESTUDO IN VITRO

4.2.1. Protocolo experimental

Para a realização da cultura primária de células musculares de camundongos mdx serão utilizados os músculos do membro pélvico de 6 camundongos das linhagens mdx e C57BL/10 com 28 dias de vida. Os animais serão anestesiados por via intra-peritoneal (IP) com solução de cloridrato de xilazina 2% (Vyrbaxyl, Virbac) e cloridrato de quetamina (Francotar, Virbac) na proporção de 1:1 e dose de 0,1 mL/30 g de peso corporal, em seguida, imediatamente serão eutanasiados por deslocamento cervical e rapidamente os músculos serão isolados em PBS contendo glicose 1% (w/v) e penicilina 1% (w/v). Durante 10 min. O tecido muscular será triturado e a suspensão digerida com colagenase II 1,5% (w/v), tripsina 2,5% (w/v) e DNase 0,1% (w/v) em DMEM contendo glicose 1% (w/v) e penicilina 1% (w/v) a 37°C por 30 min.

DMEM (15 mL) contendo soro de cavalo 10% (v/v), soro fetal bovino 10% (v/v), L-glutamina 2mM e penicilina 1% (v/v) será adicionado (meio de crescimento). A suspensão será centrifugada a 1000rpm, a 4°C por 20 min. E o sobrenadante descartado. 20 mL do meio de crescimento serão novamente adicionados, a suspensão será filtrada através de um filtro esterilizado com poros de 50 µm e as células serão sedimentadas em pratos de 13 mm cobertos com matrigel 0,1% (w/v) por 24 horas a uma densidade de 6×10^4 células por prato. Entre 4872 horas após o início da preparação das culturas, o meio de crescimento será alterado para meio de fusão contendo soro de cavalo 10% (v/v) e L-glutamina 2mM (Lyngge, J 2001, Silveira 2006). As células após o período de diferenciação (5-6 dias) serão tratadas por 24 horas com 5, 10, 20, 40 e 80 µM de S-equol (Anthem BioSciences) (Horiuchi, Usami et al. 2017). Células musculares distróficas não tratadas e células musculares obtidas da linhagem C57BL/10 serão utilizadas como controle.

4.2.2. Análise da viabilidade celular (MTT)

É uma análise colorimétrica para quantificação de metabolismo mitocondrial e atividade da cadeia respiratória de células em resposta ao medicamento. O método é baseado na redução do MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyl tetrazoliumbromide] a formazan.

Para este experimento as células (controle e tratadas) foram incubadas em soro DMEM sem fenol vermelho e em seguida foi adicionado solução MTT (SIGMA M5655) equivalente a 10% do volume de meio celular. As células retornaram para a incubadora de CO₂ e permaneceram por 3-4 horas. Após incubação, todo o meio foi retirado e foi adicionada uma quantidade igual de solvente MTT (30ml isopropanol: 100µl HCl 37% P.A). A leitura foi realizada por espectrofotômetro medindo absorbância em 570nm, utilizando o equipamento Multi-Mode Microplate Reader Model Synergy H1M (Bio-Tek Instruments). No controle negativo não foi adicionado o MTT, somente solução DMEM sem fenol vermelho. Os ensaios foram realizados em triplicata.

4.3. QUANTIFICAÇÃO DE CATALASE, NF-KB, BCL-2, BAX, MYOD, MYH3, PARP POR WESTERN BLOTTING

A dose utilizada no estudo in vitro que for mais efetiva e segura no teste de viabilidade, será a dose utilizada neste método. Após o último dia do tratamento das culturas celulares, o

meio será removido, as culturas serão lavadas com PBS, raspadas e homogeneizadas imediatamente em 300µL de tampão para homogeneização (Triton X-100 1%, tris-HCl 100mM (ph 7,4), pirofosfato de sódio 100mM, fluoreto de sódio 100mM, ETDA 10mM, ortovanadato de sódio 10 mM, PMSF 2 mM e 0,1mg/mL de aprotinina). A seguir, os extratos serão centrifugados a 11000 rpm a 4°C por 20 minutos e o sobrenadante será utilizado para análise do extrato total. A determinação de proteína foi realizada pelo método de Bradford (1976). As amostras do extrato proteico foram tratadas com tampão Laemmli (azul de bromofenol 0,1% e fosfato de sódio 1 M pH 7,0, glicerol 50% e SDS 10%), acrescido de ditioneitol 100mM, aquecidas em água fervente por 5 minutos e centrifugadas por 1 minuto. Em seguida, 30 µg de proteína serão aplicados em gel SDS-poliacrilamida a 12% em aparelho para eletroforese da Bio-Rad (mini-Protean, Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, EUA). A eletrotransferência do gel para a membrana de nitrocelulose foi realizada em 90 minutos a 120V (constante) em aparelho de transferência da Bio-Rad. As membranas foram incubadas com solução basal (Trisma base 10mM, cloreto de sódio 150mM e Tween-20 0,02%) contendo 5% de leite desnatado, por 2 horas em temperatura ambiente para reduzir a ligação não específica de proteínas. Posteriormente, foram incubadas com 10µg de anticorpo primário diluído em 10ml de solução basal contendo 1% de leite desnatado a 4°C durante a noite. No dia seguinte, as membranas serão lavadas por 30 minutos com solução basal e incubadas em 10ml de solução basal contendo 1% de leite desnatado e 2,5µg de anticorpo secundário (anti-mouse IgG Peroxidase; e/ou anti-rabbit IgG Peroxidase; e/ou anti-goat IgG Peroxidase) por duas horas em temperatura ambiente. Posteriormente, as membranas serão novamente lavadas por 30 minutos com solução basal. Para detectar as bandas imunorreativas, as membranas serão expostas à solução de quimioluminescência por 5 minutos, e o sinal fluorescente das bandas foi capturado pelo sistema GeneGnome XRQ (Syngene, Frederick, MD, EUA) e o software ImageJ foi usado para quantificar as intensidades das bandas

Para a normalização dos dados obtidos foi realizado o controle interno por meio da coloração total de proteínas utilizando Ponceau S. O protocolo consiste na reutilização das membranas previamente utilizadas para a detecção dos demais marcadores. Para tanto, as membranas foram lavadas com TBS-T (solução basal) três vezes, por 10 minutos cada. Em seguida, procedeu-se à coloração com Ponceau S (0,1% em ácido acético 5%) por aproximadamente 5 minutos, seguida da remoção do excesso de corante por lavagens sucessivas com água destilada até que as bandas proteicas ficassem nitidamente visíveis. Após a documentação da coloração, as membranas foram lavadas novamente com TBS-T para remoção

completa do Ponceau S antes da incubação com os anticorpos específicos, conforme protocolo anteriormente descrito.

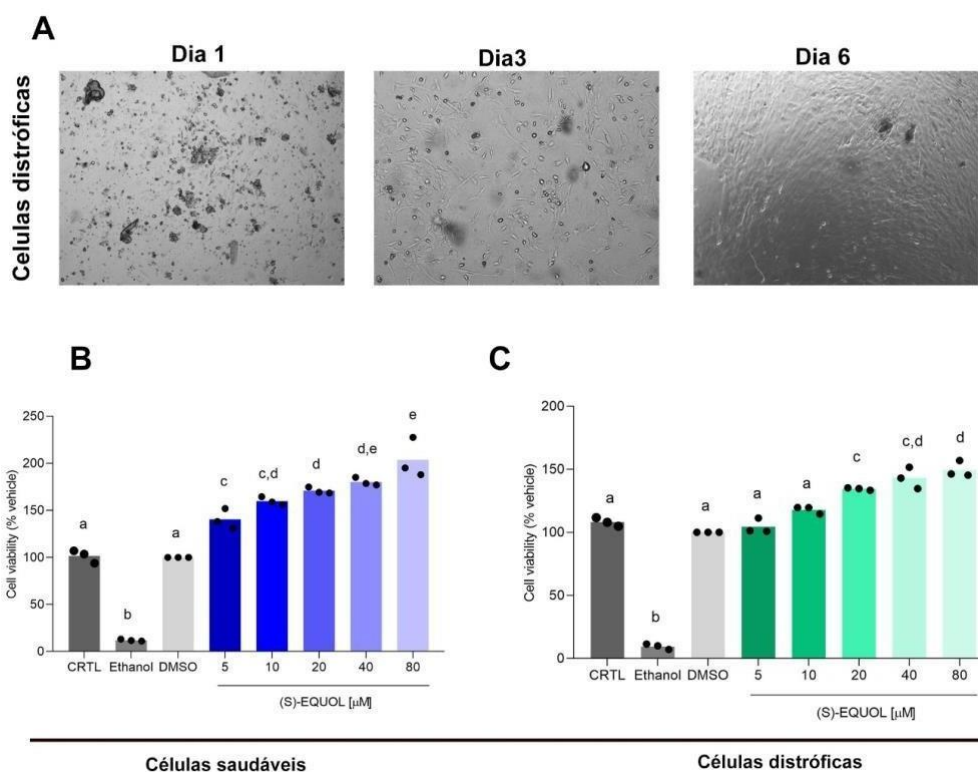
5. RESULTADOS

5.1. EFEITO DOSE-DEPENDENTE DO S-EQUOL NA PROLIFERAÇÃO, DIFERENCIAÇÃO E VIABILIDADE CELULAR DE FIBRAS MUSCULARES SAUDÁVEIS E DISTRÓFICAS.

As células musculares distróficas de camundongos controles e mdx apresentaram uma progressão típica do processo de proliferação para diferenciação e fusão, formando miotubos espessos e ramificados (Figura 2A). A viabilidade celular, avaliada pelo ensaio de MTT, indicou que o tratamento com etanol 25% reduziu significativamente a viabilidade das células distróficas (60,91%) em comparação ao grupo controle (Figura 2B).

Por outro lado, o tratamento com S-equol demonstrou efeito benéfico tanto em células musculares saudáveis quanto distróficas, promovendo um aumento significativo e dosedependente da viabilidade celular em relação ao grupo controle. Nos mioblastos wild type, os aumentos observados foram de 10,92% (5 μ M), 23,17% (10 μ M), 50,41% (20 μ M), 64,12% (40 μ M) e 81,23% (80 μ M). De forma semelhante, nas células mdx, observaram-se elevações de 50,41% (20 μ M), 64,12% (40 μ M) e 81,23% (80 μ M) (Figura 2C).

Figura 2 - Proliferação, diferenciação e viabilidade celular de fibras musculares distróficas e saudáveis tratadas com S-equol



Fonte: Autoria própria (2025).

Legenda: A: Desenvolvimento de células musculares distróficas de camundongos mdx; B: Viabilidade por MTT em células saudáveis tratadas com S-equol; C: Viabilidade celular por MTT em células distróficas de camundongos mdx tratadas com S-equol. Letras deferentes correspondem as diferenças significativas. (ANOVA One-way com teste post hoc de Tukey, $P < 0,05$).

A concentração de 40 μ M foi selecionada para as análises subsequentes por representar o ponto de platô da curva de resposta.

5.2. EFEITO DO S-EQUOL NA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS RELACIONADAS À INFLAMAÇÃO, ESTRESSE OXIDATIVO, REGENERAÇÃO E APOPTOSE EM CÉLULAS MUSCULARES SAUDÁVEIS E DISTRÓFICAS

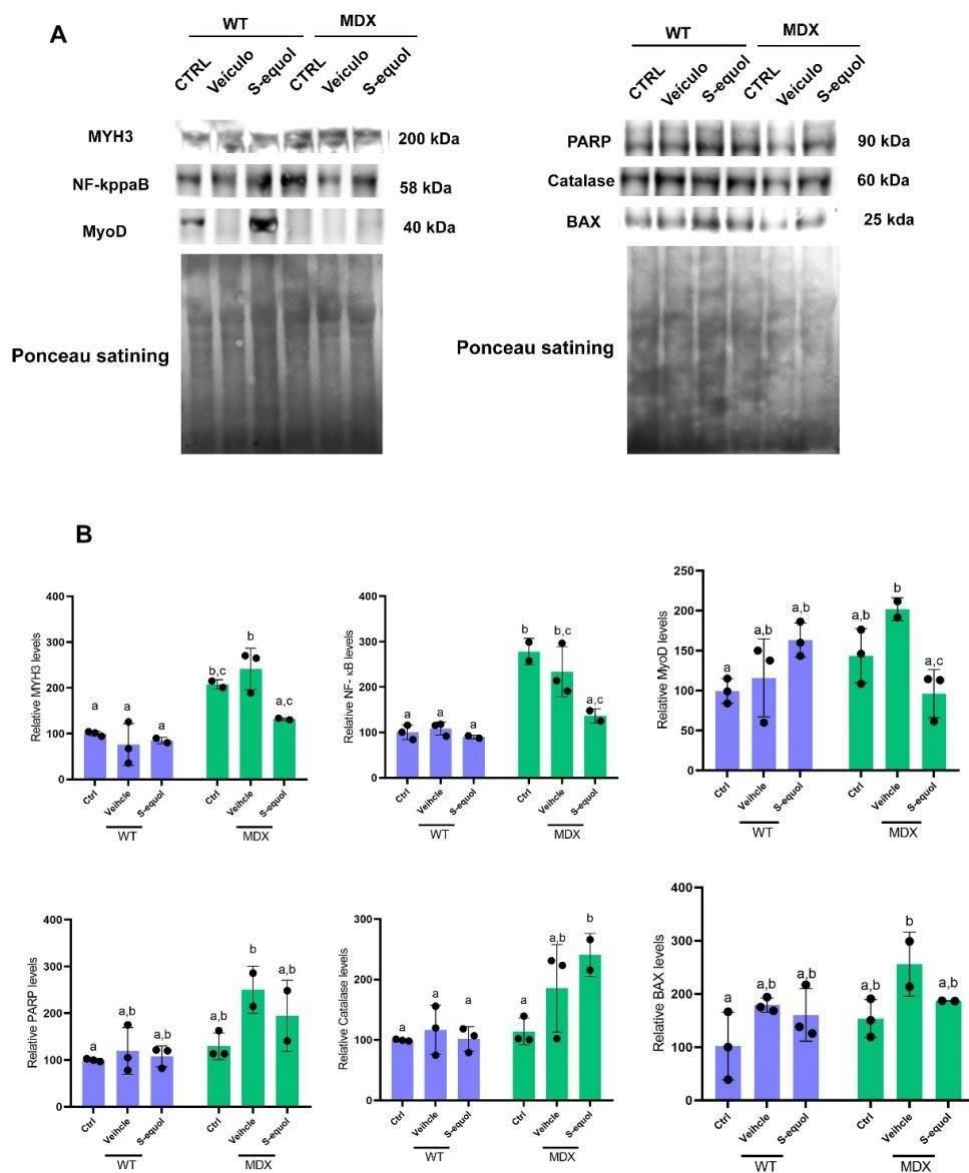
O tratamento das células musculares saudáveis, tanto com o veículo (DMSO) quanto com 40 μ M de S-equol, não resultou em alterações significativas nos níveis dos marcadores celulares avaliados (Figura 3). Em contraste, as células musculares distróficas apresentaram

diferenças estatisticamente significativas em resposta aos tratamentos administrados (DMSO e S-equol).

Células distróficas apresentam níveis elevados de NF- κ B quando comparadas às células dos animais controles, o que foi significativamente reestabelecido pelo tratamento com S-equol (redução de 39,4%). O tratamento com o modulador de ER- β também foi capaz de aumentar significativamente os níveis de catalase nas células distróficas. As fibras musculares dos camundongos mdx indicam possuir diferenças nos estágios de proliferação e diferenciação celular quando comparadas às fibras musculares saudáveis, bem como, frente aos tratamentos. Os níveis de MYH3 são significativamente maiores nas fibras musculares deficientes em distrofina (tratadas ou não com DMSO) quando comparadas com as fibras musculares saudáveis. Do mesmo modo, fibras distróficas tratadas com DMSO possuem níveis elevados de MyoD quando comparadas às fibras normais. Em ambos os casos, o tratamento com S-equol reduziu significativamente os níveis de MYH3 e MyoD em relação ao grupo mdx-veículo (45,3% e 52,3%, respectivamente).

Curiosamente, foi constatado que a administração de 2,5% de DMSO em fibras musculares distróficas aumentou significativamente os níveis proteicos dos marcadores apoptóticos BAX e PARP com relação ao grupo de células saudáveis sem tratamento.

Figura 3 - Análise dos níveis de MYH3, NF-KB, MyoD, PARP, catalase e BAX em células musculares distróficas e saudáveis tratadas com S-equol



Fonte: Autoria própria (2025).

Legenda: A: Quantificação dos marcadores MYH3, NF-KB, MyoD, PARP, catalase e BAX por Western Blotting. B: Níveis relativos de MYH3, NF-KB, MyoD, PARP, catalase e BAX em células saudáveis e distróficas. Letras deferentes correspondem as diferenças significativas. (ANOVA One-way com teste post hoc de Tukey, P < 0,05).

6. DISCUSSÃO

Com base nos resultados, esse estudo demonstra que o S-equol promoveu um aumento significativo e dose-dependente na viabilidade celular em mioblastos wild type e MDX, indicando uma ação citoprotetora relevante no contexto de células musculares. A resposta mais pronunciada nas células dos mdx, bem como a redução de viabilidade provocada pelo etanol no modelo, reforçam a hipótese de que células distróficas são mais vulneráveis a estresses e agentes agressores, enquanto compostos protetores podem ter maior efeito onde o dano basal é maior (Liu et al., 2016).

O S-equol tem afinidade seletiva por ER β , o que pode desencadear sinalização prósobrevivência e modular a diferenciação celular (Setchell et al., 2005). A ativação de vias como PI3K/Akt em outros modelos celulares associou-se ao aumento de viabilidade e redução de apoptose, hipóteses que podem ser aplicáveis ao contexto miogênico estudado (Setchell, 2005; Xu et al., 2022). Além disso, o potencial antioxidante do Equol é bem documentado e fornece um segundo mecanismo que pode explicar os resultados. Equol e seus derivados têm atividade antioxidante e anti-inflamatória em diferentes modelos celulares e animais, reduzindo espécies reativas de oxigênio e modulando respostas de defesa celular (Arai et al., 2002; Torres et al., 2022). Esse mecanismo apresenta uma explicação plausível para o aumento de viabilidade observado nas concentrações mais elevadas do composto. A diminuição do estresse oxidativo representa uma explicação plausível para o aumento de viabilidade observado, especialmente nas concentrações mais altas, uma vez que células distróficas apresentam desequilíbrio redox basal e maior acúmulo de espécies reativas (Liu et al., 2016; Wang & Zhou, 2023). A análise da curva dose - resposta, que apresentou platô em aproximadamente 40 μ M, sugere a presença de fenômenos farmacodinâmicos de saturação, como ocupação máxima de receptores ou limitação de difusão intracelular. O fato de não haver toxicidade evidente até 80 μ M sustenta uma possível janela terapêutica segura para estudos futuros.

A morfologia das culturas de células musculares distróficas, miotubos espessos e ramificados, indica que o S-equol não inibiu a diferenciação e pode, potencialmente, favorecer a maturação miogênica. Estudos com fitoestrogênios e equol em outros tecidos mostram estímulo à diferenciação via ER β e regulação de marcadores diferenciativos, o que fortalece a

hipótese de que os efeitos observados aqui podem incluir modulação favorável da diferenciação (Gelder et al., 2013). Essa hipótese se alinha com trabalhos recentes que descrevem o potencial do equol em modular vias de maturação celular e homeostase mitocondrial (Wang & Zhou, 2023).

Os resultados obtidos a partir da quantificação de marcadores apoptóticos, miogênicos e inflamatórios, demonstram que as células e as fibras musculares distróficas dos camundongos mdx exibem alterações consistentes com a fisiopatologia da DMD. A presença elevada de NFkB é um indicativo de efeitos inflamatórios crônicos, necrose e prejuízo da degeneração muscular, pois atua em fibras musculares regenerativas e estabelece um ambiente catabólico que promove dano tecidual (Acharyya et al., 2007). Assim, a redução de NF-kB recorrente do tratamento com S-equol sugere que o composto foi capaz de modular um eixo central da progressão da doença, o que converge com evidências de que a inibição farmacológica do modulador pró-inflamatória melhora significativamente a patologia e a função muscular (Acharyya et al., 2007). No que se refere ao efeito antioxidante, a catalase atua no desequilíbrio redox reduzindo os níveis elevados de EROs que excedem a capacidade antioxidante intrínseca nos tecidos musculares distróficos (Mendes et al., 2021). Desse modo, o aumento associativo da catalase induzido pelo S-equol no presente estudo expõe um efeito citoprotetor e a modulação positiva da capacidade antioxidante nas fibras distróficas.

O marcador MYH3 é uma miosina neonatal expressa durante o desenvolvimento muscular inicial e reexpressa durante o reparo muscular, sendo um indicativo de regeneração e maturação muscular (Preethy et al., 2025). No que se refere à patologia da doença, a presença deste marcador sugere regeneração muscular aprimorada e ativação de células-tronco (Preethy et al., 2025). Estudos mostram que a regulação da transcrição de MYH3 modula o avanço da diferenciação miogênica e normaliza a progressão regenerativa (Jiang et al., 2024), assim como apresentado pelo tratamento com S-equol nas células distróficas. A expressão de MyoD caracteriza um marco inicial da ativação miogênica no músculo esquelético, pois atua como o fator de transcrição que inicia o programa miogênico de diferenciação celular a partir da ativação de células satélites (Nicholls et al., 2025). Em condições distróficas, há expressão elevada de MyoD devido a tentativa de regeneração muscular e ativação crônica de células satélites, esse ciclo repetitivo leva à reexpressão de MyoD nas fibras musculares e intensifica a patologia (Boyer et al., 2022). Estudos em modelo murino realizado por Boyer et al. (2022), comprovam que a supressão da reexpressão de MyoD resulta em melhora histopatológica e

aumento da estabilidade do sarcolema. Assim, ao analisar que o S-equol promoveu redução na expressão do fator de transcrição nas células distróficas, evidencia-se seu efeito benéfico.

Ademais, MYOD1 associado com TRP53 são promotores do gene pró-apoptótico BBC3 que está diretamente associado à inativação de proteínas anti-apoptóticas, como BCL-2 e BAX, o que favorece a morte celular (Dabur & Yadav, 2024). Em suma, a redução de MyoD pelo S-equol denuncia a redução da hiperativação de células satélites, a regulação da miogênese e a inibição de vias pró-apoptóticas. O aumento de BAX e PARP na concentração de 2,5% de DMSO indica efeito pró-apoptótico que intensifica a vulnerabilidade das células mdx. No que se refere a BAX, sua ativação promove permeabilização mitocondrial e consequente apoptose (Dabur & Yadav, 2024) e, adicionalmente, estudos comprovam que a BAX atua como moduladora da diferenciação mioblástica basal, o que indica forte influência sobre funções celulares basais (Brayer, et al., 2017). Enquanto ao marcador PARP, sua ativação causa liberação de AIF (fator indutor de apoptose), fragmentação do DNA e citotoxicidade (Hong et al., 2004).

Em conjunto, os resultados apresentados indicam que o S-equol tem a capacidade de atuar em múltiplos eixos patológicos da DMD, com efeitos antiinflamatório, antioxidante e miogênico. O efeito do DMSO sobre marcadores pró-apoptóticos demonstra que o efeito terapêutico é exclusivo do S-equol e sugere-se uma redução na concentração do DMSO como solvente a fim de anular os efeitos indesejados sobre a fisiopatologia. Assim, a coerência dos resultados demonstra que a modulação simultânea do NF- κ B, do estresse oxidativo, dos reguladores de miogênese e dos eixos apoptóticos sustentam o S-equol como potencial recurso terapêutico promissor para a DMD.

7. CONCLUSÃO

A Distrofia Muscular de Duchenne permanece uma condição grave e sem cura, marcada por inflamação persistente, estresse oxidativo e prejuízo da regeneração muscular, o que reforça a necessidade de terapias que atuem em múltiplos eixos fisiopatológicos. Nesse cenário, o Sequol destaca-se pela alta seletividade por ER- β , perfil farmacocinético favorável e potente ação antioxidante, mostrando-se mais previsível e seguro que SERMs sintéticos. No presente estudo, o S-equol aumentou de forma significativa e dose-dependente a viabilidade celular em mioblastos saudáveis e distróficos favorecendo o processo proliferativo e de diferenciação miogênica. Ademais, reduziu a expressão de marcadores de estresse celular e de processos inflamatórios, evidenciando sua ação citoprotetora. Portanto, o composto surge como candidato promissor para futuras abordagens terapêuticas e estudos adicionais, incluindo testes in vivo e análises com efeito sistêmico e a longo prazo.

8. REFERÊNCIAS

ACHARYYA, S. *et al.* Interplay of IKK/NF-kappaB signaling in macrophages and myofibers promotes muscle degeneration in Duchenne muscular dystrophy. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 4, p. 889–901, 2007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17380205/>. Acesso em: 18 nov. 2025.

ARAI, M.; WATANABE, S.; KIM, J. *et al.* Antioxidant effects of equol on bovine aortic endothelial cells. **Life Sciences**, v. 71, n. 16, p. 2147–2157, 2002. Disponível em: <https://cuk.elsevierpure.com/en/publications/antioxidant-effects-of-equol-on-bovine-aorticendothelial-cells>. Acesso em: 05 nov. 2025.

BIGGAR, W. D. *et al.* Duchenne muscular dystrophy: current knowledge, treatment, and future prospects. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, n. 401, p. 88–106, 2002. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12151886/>. Acesso em: 07 out. 2025.

BOLIC, B. *et al.* Reactions of superoxide dismutases with HS(-)/H₂S and superoxide radical anion: An in vitro EPR study. **Nitric Oxide**, v. 51, p. 19–23, 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26436856/>. Acesso em: 24 nov. 2025.

BOYER, J. G. *et al.* Depletion of skeletal muscle satellite cells attenuates pathology in muscular dystrophy. **Nature Communications**, v. 13, n. 1, 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35618700/>. Acesso em: 03 nov. 2025.

BRAYER, S. *et al.* The pro-apoptotic BAX protein influences cell growth and differentiation from the nucleus in healthy interphasic cells. **Cell Cycle**, v. 16, n. 21, p. 2108–2118, 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28933587/>. Acesso em: 11 out. 2025.

DABUR, R.; YADAV, A. Programmed cell death and its implications for skeletal muscle wasting. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, 2024. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/380115226_Programmed_Cell_Death_and_its_Implications_for_Skeletal_Muscle_Wasting. Acesso em: 29 out. 2025.

GELDER, N.; FURMAN, D.; JOHNSON, R. Combined effects of resveratrol and equol on mitochondrial biogenesis in human endothelial cells. **Immunity & Ageing**, v. 10, p. 28, 2013. Disponível em: <https://immunityageing.biomedcentral.com/articles/10.1186/1742-493310-28>. Acesso em: 12 nov. 2025.

HONG, S. J.; DAWSON, T. M.; DAWSON, V. L. Nuclear and mitochondrial conversations in cell death: PARP-1 and AIF signaling. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 25, n. 5, p. 259–264, 2004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15120492/>. Acesso em: 02 out. 2025.

JIANG, C. *et al.* FOXO1 regulates bovine skeletal muscle cells differentiation by targeting MYH3. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 260, p. 129643, 2024. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38253149/>. Acesso em: 21 nov. 2025.

KATZENELLENBOGEN, B. S. *et al.* Molecular mechanisms of estrogen action: selective ligands and receptor pharmacology. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 74, n. 5, p. 279–285, 2000. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11162936/>. Acesso em: 14 out. 2025.

LIU, Y. *et al.* Equol attenuates atherosclerosis by inhibiting ER stress through Nrf2 activation in endothelial cells. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2016, p. 1–12, 2016. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5132403/>. Acesso em: 17 nov. 2025.

MANNING, J.; O'MALLEY, D. What has the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy contributed to our understanding of this disease? **Journal of Muscle Research and Cell Motility**, v. 36, n. 2, p. 155–167, 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25669899/>. Acesso em: 09 nov. 2025.

MENDES, S. V. D. *et al.* Efeitos de diferentes volumes de exercício físico aeróbico sobre a atividade da enzima catalase em diferentes tipos de fibras músculo esquelético em ratos Wistar. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 4, p. 41348–41356, 2021. Disponível em: <https://ojs.brazilianjournals.com.br/ojs/index.php/BRJD/article/view/28687>. Acesso em: 22 out. 2025.

NICHOLLS, A. *et al.* Exercise-induced MyoD mRNA expression in young and older human skeletal muscle: A systematic review and meta-analysis. **Sports Medicine**, v. 55, n. 7, p. 1625–1649, 2025. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/40317450/>. Acesso em: 03 out. 2025.

PREETHY, S. *et al.* Enhanced expression of dystrophin, IGF-1, CD44 and MYH3 in plasma and skeletal muscles including diaphragm of mdx mice after oral administration of

NeuREFIX beta 1,3-1,6 glucan. **Scientific Reports**, v. 15, p. 7232, 2025. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/40021828/>. Acesso em: 17 nov. 2025.

SETCHELL, K. D. R. *et al.* S-Equol, a potent ligand for estrogen receptor β , is the exclusive enantiomeric form of equol produced by humans after soy consumption. **Journal of Nutrition**, v. 135, n. 5, p. 1235–1239, 2005. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15883431/>. Acesso em: 12 nov. 2025.

SETCHELL, K. D. R. Soy isoflavones benefits and risks from nature's selective estrogen receptor modulators (SERMs). **Journal of the American College of Nutrition**, v. 24, n. 2, p. 100–110, 2005. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11603644/>. Acesso em: 27 out. 2025.

TORRES, W.; LIMA, A.; CARVALHO, F. *et al.* Soy-derived equol induces antioxidant activity in zebrafish in an Nrf2-independent manner. **Antioxidants**, v. 11, n. 5, p. 1023, 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35563633/>. Acesso em: 14 nov. 2025.

WANG, S.; ZHOU, Y. Advances in the metabolic mechanism and functional characteristics of equol. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 11, p. 9876, 2023. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10297411/>. Acesso em: 19 nov. 2025.

WHITEHEAD, N. P.; YEUNG, E. W.; ALLEN, D. G. Muscle damage in mdx (dystrophic) mice: role of calcium and reactive oxygen species. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 33, n. 7, p. 657–662, 2006. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16789936/>. Acesso em: 08 nov. 2025.

YIU, E. M.; KORNBERG, A. J. Duchenne muscular dystrophy. **Journal of Paediatrics and Child Health**, v. 51, n. 8, p. 759–764, 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25752877/>. Acesso em: 23 nov. 2025.

ZHANG, Xia. *et al.* S-Equol enhances osteoblastic bone formation and prevents bone loss through OPG/RANKL via the PI3K/Akt pathway in streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of Functional Foods**, v. 95, p. 105181, 2022. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9633996/>. Acesso em: 17 nov. 2025.

9. ANEXOS

Anexo 1- Certificado CEUA



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG
Lei nº 11.154, de 29 de julho de 2005

Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UNIFAL-MG

Certificado

Certificamos que a proposta intitulada **MECANISMOS CELULARES ENVOLVIDOS NO POTENCIAL BENEFÍCIO DA ADMINISTRAÇÃO DE S-EQUOL, UM MODULADOR SELETIVO DO RECEPTOR DE ESTROGÊNIO BETA (ER-B), EM CAMUNDONGOS MDX, MODELO MURINO DA DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE**, registrada com o nº **0020/2025**, sob a responsabilidade de **Tulio de Almeida Hermes**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de **pesquisa científica**, com vigência de **01/09/2025 a 30/09/2028**, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UNIFAL) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS.

Espécie/linhagem/raça	Total de animais	Total de machos	Total de fêmeas	Origem
Rodent / C57bl/10-dmdmdx	77	63	14	Biotério do departamento de anatomia

Alfenas, 26 de Novembro de 2025

Prof(a). Dr(a). Lisandra Brandino de Oliveira
Coordenador(a) do CEUA/UNIFAL - MG

Para verificar autenticidade acesse: <http://sistemas.unifal-mg.edu.br/app/consumo/autenticidade/certificado/> e digite a chave: a4b739a2d46c13e0ae15e75842eb998