

Efeito do dimetil fumarato e do monometil fumarato *in vitro* sobre o perfil das células dendríticas mieloides na EAE

Palavras-chave: Imunologia celular, Esclerose múltipla, Doenças autoimunes.

Autores/as:

THIAGO LUIZ ROCHA NATIVIDADE (UNICAMP)
RODRIGO MIRANDA DE CARVALHO (UNICAMP)
BRENO BANDONI FERRARI (UNICAMP)
SANDRA LUCIA SALGADO RIVERO (UNICAMP)
AMANDA DIAS DE ROCHA LIMA (UNICAMP)
FERNANDO PRADELLA (UNICAMP)
ELAINE CONCEIÇÃO DE OLIVEIRA (FATEC-Sorocaba)

Orientadora:

Prof.^a Dr.^a LEONILDA MARIA BARBOSA DOS SANTOS (UNICAMP)

Suporte financeiro: FAPESP, CNPq, CAPES, INCT-NIM e Biogen Idec

Introdução:

A Esclerose Múltipla (EM) é uma doença de caráter autoimune, crônica e desmielinizante que acomete o Sistema Nervoso Central (SNC) de adultos jovens. Ela é resultante de uma predisposição genética combinada à fatores ambientais que permitem o aparecimento de um infiltrado inflamatório de leucócitos no SNC e a produção de autoanticorpos contra antígenos próprios da mielina central (NYLANDER; HAFLE, 2012).

Infelizmente, tal doença não possui cura, mas diversos tratamentos estão disponíveis para uso pela população. Dentre eles, existe o remédio oral dimetil fumarato (DMF), cujo nome comercial é Tecfidera (da farmacêutica Biogen). O fármaco, metabolizado no intestino de pacientes em sua forma ativa, monometil fumarato (MMF), reduz de forma significativa a taxa anual de surtos e a progressão da deficiência neurológica de pacientes com EM (GOLD; KAPPOS; ARNOLD; BAR-OR; GIOVANNONI; SELMAJ; TORNATORE; SWEETSER; YANG; SHEIKH, 2012). Ainda, o número de novas lesões demonstradas por imagem de ressonância magnética também foi reduzido (FOX; MILLER; PHILLIPS; HUTCHINSON; HAVRDOVA; KITA; YANG; RAGHUPATHI; NOVAS; SWEETSER, 2012). Entretanto, apesar da eficiência médica comprovada do DMF para o tratamento de EM, seus mecanismos de ação não foram completamente desvendados, justificando maiores estudos sobre seus efeitos.

Usando o modelo experimental da EM em camundongos, a Encefalomielite Experimental Autoimune (EAE), podemos observar a ação de células do sistema imune durante a doença. Sabe-se que células T reguladoras (Treg) estão envolvidas no controle da EAE, justamente por seu papel de regular outros componentes da resposta imune, mas parecem não estar tão presentes na fase inflamatória da EM (COBBOLD; CASTEJON; ADAMS; ZELENKA; GRACA; HUMM; WALDMANN, 2004). Tais células são formadas quando linfócitos T naive não são ativadas totalmente por células dendríticas (DCs), importantes apresentadores de antígenos. Assim, elas acabam não desenvolvendo um perfil tolerogênico, que em casos normais impediria autoimunidades (RUTELLA; LEMOLI, 2004).

As DCs podem se desenvolver em vários subtipos distintos, cada um cumprindo uma função. Em seu subtipo imunogênico, marcado pela expressão apenas de CD11c, elas seriam maduras, ativando plenamente os linfócitos T e os induzindo a um fenótipo imunogênico inflamatório. No subtipo tolerogênico, identificado pela expressão de CD11b ou CD11b/CD11c, elas estariam em um estado de maturação menos avançado, o que lhes conferiria uma menor capacidade de ativar linfócitos T, resultando na diferenciação desses linfócitos em subtipos anti-inflamatórios, como as Treg (LIO; HSIEH, 2011).

Portanto, o presente projeto se propõe a investigar o efeito do DMF e MMF sobre DCs murinas geradas *in vitro*. Tendo em vista tais pontos, podemos questionar se os efeitos do DMF poderiam advir da ação dele sobre o processo de desenvolvimento das DCs, ou através da modulação das DCs já maduras, induzindo-as, em ambos os casos, a ter um caráter tolerogênico, gerando células Treg. É possível também que o DMF, após sua conversão a MMF, aja na ativação do receptor HCAR2, que é expresso em variados tipos celulares, incluindo DCs (CHEN; ASSMANN; KRENZ; RAHMAN; GRIMM; KARSTEN; KÖHL; OFFERMANN; WETTSCHURECK; SCHWANINGER, 2014), reduzindo a resposta inflamatória geral.

Metodologia:

As DCs serão geradas *in vitro* na presença ou não de DMF e MMF. As DCs serão geradas a partir de precursores da medula óssea extraídos dos fêmures e tíbias de camundongos C57BL/6J. Os precursores da medula serão extraídos com o auxílio de uma seringa com agulha, por meio de jatos da solução balanceada de Hanks e posteriormente centrifugados. As células vermelhas do sangue serão lisadas com tampão de lise de hemácias e as células serão cultivadas por 12 dias em um meio RPMI acrescido de 10% soro fetal bovino, 10ng/ml de GM-CSF, 1% de antibiótico e 1% de glutamina. A partir do dia 2 de cultura, parte das células receberá DMF na concentração de 70uM, outro grupo de células receberá o MMF na concentração de 50uM, e outro grupo não receberá nenhum tratamento. O meio será trocado a cada 2 dias ou antes, se necessário. Após os 12 dias, a maior parte das células permanecerá aderente e as DCs imaturas serão induzidas à maturação com LPS (5ng/ml, por 24h).

Passados os 12 dias de cultura, as amostras serão analisadas por citometria de fluxo. Anticorpos reativos a camundongo anti-CD11b BV-421, anti-CD11c APC-Cy7, anti-CD80 BUV 325, anti-CD86 BUV-775 e anti-HCAR-2 PE serão utilizados para marcação. Todas as amostras serão incubadas por 30 minutos, a temperatura ambiente, na ausência de luz, ressuspendidas em 100ul de PBS1x acrescido de 1% de SFB contendo todos os anticorpos acima listados. Como controle, serão preparadas uma amostra sem marcação (branco), além

de controle isotópico de cada fluorocromo. Após o período de incubação, as amostras serão lavadas com 1ml de PBS1x e centrifugadas a 1200 rpm, por 10 minutos, para precipitar as células. O sobrenadante será descartado e o pellet de células será ressuscitado em 300ul de PBS1x. As amostras, então, estarão prontas para serem adquiridas em um citômetro de fluxo FACs Symphony (BD, USA). Todos os arquivos serão analisados no programa FlowJo 10.

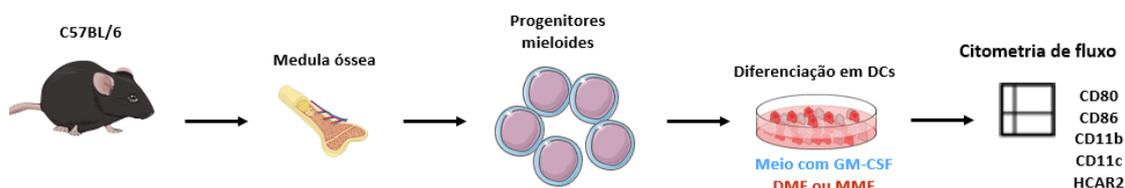


Figura 1 – Processo para a análise por citometria de fluxo de CD80, CD86, CD11b, CD11c e HCAR2

Adicionalmente, a expressão gênica da enzima IDO, contribuinte para a regulação metabólica do sistema imune pela ativação de receptor celular HCAR2 (MUNN; MELLOR, 2013), será avaliada nas DCs por qPCR em tempo-real. As amostras de RNA das células serão extraídas com auxílio da coluna de extração QiagenRNAeasy e serão convertidos em cDNA com o kit High-CapacitycDNA (AppliedBiosystem), conforme instruções das fabricantes. Os qPCRs em tempo real serão feitos na máquina 7500 fast real-time PCR system, da AppliedBiosystem. Primers marcados com taqman serão obtidos da Applied Biosystem para a análise de expressão de IDO. Como controle endógeno, será usado primer de β 2–microglobulina (B2m).

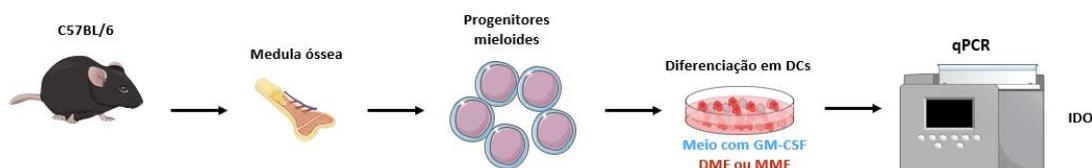


Figura 2 – Processo para a leitura qPCR da expressão de IDO

Por fim, caso sejam observadas modificações fenotípicas nas DCs geradas in vitro na presença de DMF ou MMF, as células serão geradas novamente e transferidas adotivamente a camundongos C57BL/6 com EAE para avaliação clínica. As DCs geradas a partir das células precursoras da medula óssea de fêmures e tíbias serão injetadas na veia da cauda dos camundongos um dia antes da indução da EAE, sendo a injeção será composta de 5×10^5 DCs em 50 μ L de PBS, por animal. Para induzir a doença, os camundongos serão imunizados por via subcutânea com 100 mg de pMOG35-55, peptídeo sintetizado por GenemedSynthesis, CA, USA, em 0.1 ml de PBS em emulsão com igual volume de adjuvante completo de Freund enriquecido com 200ug de MT inativado/ml de emulsão. Cada camundongo receberá 200ng da toxina Pertussis intraperitonealmente nos dias 0 e 2 após a imunização. A avaliação clínica dos animais seguirá por 30 dias, onde eles serão observados diariamente, a partir do nono dia após a imunização. Para avaliar a evolução clínica, será atribuído os seguintes scores: grau 0: animal normal, sem sinais clínicos; grau 1 = perda do tônus da cauda; grau 2 = paraplegia; grau 3 = Emagrecimento abdominal; grau 4 = tetraplegia; grau 5 = morte.



Figura 3 – Processo de imunização em camundongos com EAE e acompanhamento clínico

Resultados esperados:

A nossa hipótese é que o tratamento com DMF e MMF modularia as expressões gênicas e proteicas nas DCs. Assim sendo, elas atuariam com um caráter tolerogênico em detrimento do imunogênico, o que favoreceria, pelo menos em tese, a melhora clínica observada nos pacientes de EM tratados com DMF. Portanto, nossa suspeita é que verificaremos um aumento de IDO e das proteínas decorrentes da ativação do receptor HCAR2. Também suspeitamos que haverá um aumento da expressão de TTP, o que ajudaria a justificar a linfopenia de pacientes tratados com DMF, uma vez que a TTP inibe a produção de IL-27, a qual promove a produção do fator de transcrição EOMES que, por sua vez, induz as células TCD8 a se proliferarem.

Bibliografia:

- NYLANDER, Alyssa; HAFLER, David A.. Multiple sclerosis. **Journal Of Clinical Investigation**, [S.L.], v. 122, n. 4, p. 1180-1188, 2 abr. 2012. American Society for Clinical Investigation. <http://dx.doi.org/10.1172/jci58649>
- FOX, Robert J.; MILLER, David H.; PHILLIPS, J. Theodore; HUTCHINSON, Michael; HAVRDOVA, Eva; KITA, Mariko; YANG, Minhua; RAGHUPATHI, Kartik; NOVAS, Mark; SWEETSER, Marianne T.. Placebo-Controlled Phase 3 Study of Oral BG-12 or Glatiramer in Multiple Sclerosis. **New England Journal Of Medicine**, [S.L.], v. 367, n. 12, p. 1087-1097, 20 set. 2012. Massachusetts Medical Society. <http://dx.doi.org/10.1056/nejmoa1206328>.
- GOLD, Ralf; KAPPOS, Ludwig; ARNOLD, Douglas L.; BAR-OR, Amit; GIOVANNONI, Gavin; SELMAJ, Krzysztof; TORNATORE, Carlo; SWEETSER, Marianne T.; YANG, Minhua; SHEIKH, Sarah I.. Placebo-Controlled Phase 3 Study of Oral BG-12 for Relapsing Multiple Sclerosis. **New England Journal Of Medicine**, [S.L.], v. 367, n. 12, p. 1098-1107, 20 set. 2012. Massachusetts Medical Society. <http://dx.doi.org/10.1056/nejmoa1114287>.
- MUNN, David H.; MELLOR, Andrew L.. Indoleamine 2,3 dioxxygenase and metabolic control of immune responses. **Trends In Immunology**, [S.L.], v. 34, n. 3, p. 137-143, mar. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2012.10.001>.

CHEN, Hui; ASSMANN, Julian C.; KRENZ, Antje; RAHMAN, Mahbubur; GRIMM, Myriam; KARSTEN, Christian M.; KÖHL, Jörg; OFFERMANN, Stefan; WETTSCHURECK, Nina; SCHWANINGER, Markus. Hydroxycarboxylic acid receptor 2 mediates dimethyl fumarate's protective effect in EAE. **Journal Of Clinical Investigation**, [S.L.], v. 124, n. 5, p. 2188-2192, 1 abr. 2014. American Society for Clinical Investigation. <http://dx.doi.org/10.1172/jci72151>.

PARODI, Benedetta; ROSSI, Silvia; MORANDO, Sara; CORDANO, Christian; BRAGONI, Alberto; MOTTA, Caterina; USAI, Cesare; WIPKE, Brian T.; SCANNEVIN, Robert H.; MANCARDI, Giovanni L.. Fumarates modulate microglia activation through a novel HCAR2 signaling pathway and rescue synaptic dysregulation in inflamed CNS. **Acta Neuropathologica**, [S.L.], v. 130, n. 2, p. 279-295, 29 abr. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00401-015-1422-3>.

KLEIN, Ludger; JOVANOVIC, Ksenija. Regulatory T cell lineage commitment in the thymus. **Seminars In Immunology**, [S.L.], v. 23, n. 6, p. 401-409, dez. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.smim.2011.06.003>.

LIO, Chan-Wang J; HSIEH, Chyi-Song. Becoming self-aware: the thymic education of regulatory t cells. **Current Opinion In Immunology**, [S.L.], v. 23, n. 2, p. 213-219, abr. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.coi.2010.11.010>.

COBBOLD, Stephen P.; CASTEJON, Raquel; ADAMS, Elizabeth; ZELENKA, Diana; GRACA, Luis; HUMM, Susan; WALDMANN, Herman. Induction of foxP3+ Regulatory T Cells in the Periphery of T Cell Receptor Transgenic Mice Tolerized to Transplants. **The Journal Of Immunology**, [S.L.], v. 172, n. 10, p. 6003-6010, 5 maio 2004. The American Association of Immunologists. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.172.10.6003>.

LAFAILLE, Maria A. Curotto de; KUTCHUKHIDZE, Nino; SHEN, Shiqian; DING, Yi; YEE, Herman; LAFAILLE, Juan J.. Adaptive Foxp3+ Regulatory T Cell-Dependent and -Independent Control of Allergic Inflammation. **Immunity**, [S.L.], v. 29, n. 1, p. 114-126, jul. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2008.05.010>.

RUTELLA, Sergio; LEMOLI, Roberto M. Regulatory T cells and tolerogenic dendritic cells: from basic biology to clinical applications. **Immunology Letters**, [S.L.], v. 94, n. 1-2, p. 11-26, jun. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.imlet.2004.04.015>.

BLANCO, P; A PALUCKA,; PASCUAL, V; BANCHEREAU, J. Dendritic cells and cytokines in human inflammatory and autoimmune diseases. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, [S.L.], v. 19, n. 1, p. 41-52, fev. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cytogfr.2007.10.004>.