



Efeitos in vitro de monometil e dimetil fumarato em células dendríticas

Palavras-chave: Imunologia celular, Imunologia básica, 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 EM é uma doença autoimune, crônica e desmielinizante, resultante de uma predisposição genética combinada à fatores ambientais que levam ao aparecimento de um infiltrado inflamatório de leucócitos no SNC e a produção de autoanticorpos contra antígenos próprios da mielina central (1). O remédio oral DMF (cujo nome comercial é Tecfidera, da farmacêutica Biogen), convertido dentro de Células Dendríticas (DCs) em seu metabólito ativo, o MMF, é opção de tratamento para EM. Entretanto, apesar de seus efeitos benéficos, os mecanismos de ação do DMF ainda não estão completamente elucidados.

Sabe-se que células reguladoras, as Treg, desempenham um papel importante no controle do modelo experimental da EM, a EAE, ao promover a manutenção de um microambiente antiinflamatório e impedir a ação de outras células efetoras. Células Treg podem ser formadas a partir de linfócitos T CD4+ naive com a participação de DCs (5, 6), apresentadoras de antígenos altamente especializadas e com capacidade de ativar completamente linfócitos T. DCs imunogênicas, marcadas pela expressão de CD11c, seriam maduras o suficiente para ativar plenamente os linfócitos T, induzindo-os a um fenótipo imunogênico inflamatório. Por outro lado, DCs tolerogênicas, identificadas por serem CD11b+ ou CD11b+/CD11c+, estariam em um estado de maturação menos avançado, o que lhes conferiria uma menor capacidade de ativar linfócitos T naive, resultando na diferenciação desses linfócitos no subtipo Treg (9).

Assim, cumpre questionar se DMF agem no sentido de formar DCs tolerogênicas, uma vez que tais células o absorvem e o convertem na forma ativa. Tal ocorrência o que poderia explicar em parte os efeitos observados da droga. 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 foram geradas a partir de precursores da medula óssea extraídos dos fêmures e tíbias de camundongos C57BL/6J. Os precursores da medula foram extraídos com o auxílio de uma seringa com agulha, por meio de jatos da solução balanceada de Hanks e posteriormente centrifugados, com as células vermelhas do sangue sendo lisadas com tampão de lise de hemácias e as células progenitoras cultivadas por 12 dias. O meio consistiu em 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 recebeu DMF na concentração de 70uM, outro grupo o MMF na concentração de 50uM, e outro grupo nenhum tratamento (somente o veículo, DMSO). O meio foi trocado a cada 2 dias ou antes, quando necessário. Após os 12 dias, DCs imaturas foram induzidas à maturação com LPS (5ng/ml, por 24h). Para qPCR, metade das células foram expostas, também após 12 dias, ao inibidor de Hcar2, Mepenzolato Bromide (MB, 0,2mM).

Anticorpos reativos a camundongo anti-CD11b BV-421, anti-CD11c APC-Cy7, anti-CD80 BUV 325, antiCD86 BUV-775, anti-HCAR-2 PE e anti-MHCII Pe-Cy7 foram utilizados para marcação. Todas as amostras foram incubadas por 30 minutos, a temperatura ambiente, na ausência de luz, ressuspensas em 100ul de PBS1x acrescido de 1% de SFB contendo todos os anticorpos acima listados. Como controle, uma amostra sem marcação (branco) foi preparada, além do controle isotópico de cada fluorocromo. Após o período de incubação, as amostras foram lavadas com 1ml de PBS1x e centrifugadas a 1200 rpm, por 10 minutos, para precipitar as células. O sobrenadante foi guardado e o pellet de células ressuspensas em 300ul de PBS1x. As amostras foram assim adquiridas em um citômetro de fluxo FACs Symphony (BD, USA), e todos os arquivos analisados no programa FlowJo 10.

As células da cultura DC tiveram o mRNA total extraído usando o kit RNAeasy mini (seguindo as instruções do fabricante), sendo ele posteriormente convertido em cDNA usando o kit High Capacity cDNA (de acordo com as recomendações do fabricante) em um termociclador (AppliedBiosystem). Os qPCRs em tempo real foram feitos na máquina 7500 fast real-time PCR system, da AppliedBiosystem. Primers marcados com taqman foram obtidos da Applied Biosystem para a análise de expressão de IDO-1, Hcar 2, Zfp36 e IL 27. Como controle endógeno, foi usado primer de β 2-microglobulina (B2m).

Análises estatísticas foram realizadas com a aplicação de testes não paramétricos no software GraphPad Prism 6. Foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis para a comparação de três ou mais grupos, seguido do teste de Mann-Whitney para comparação entre pares. Diferenças foram consideradas significativas se apresentarem um valor $p < 0.05$.

RESULTADOS PARCIAIS

Quando analisamos os resultados pela citometria de fluxo, vemos que a expressão de algumas moléculas relacionadas a apresentação de antígenos entre as diferentes populações, podemos observar uma diferença estatisticamente significativa nas populações CD11b+ que expressam CD86 e MHC de classe II e que seriam, pelo menos em tese, tolerogênicas (Figuras A e B). Dessa forma, a nossa hipótese é que os tratamentos com DMF ou MMF in vitro têm favorecido a apresentação de antígeno de células dendríticas com caráter tolerogênico e, por consequência, favorecido também a formação de células T reg.

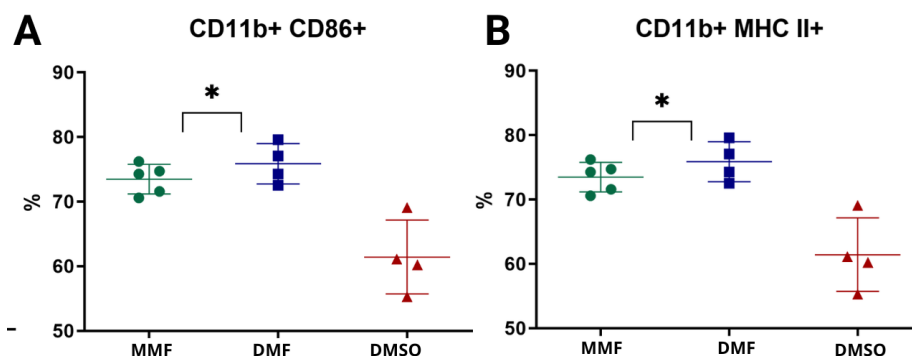


Figura I - Gráfico de pontos expondo as porcentagens de DCs CD11b+CD86+ nas populações tratadas com MMF, DMF e veículo; Figura J - Gráfico de pontos expondo as porcentagens de DCs CD11b+MHC II+ nas populações tratadas com MMF, DMF e veículo.

Analizando a qPCR, temos que a expressão de IDO e HCAR-2 se mostrou significativamente elevada quando as células foram tratadas com MMF em relação ao tratamento com DMF (fig x e x). Tais resultados de expressão também corroboram a hipótese de que a presença de MMF no microambiente fariam com que as células pendessem para um perfil tolerogênico, uma vez que ambos os fatores contribuem para a regulação metabólica do sistema imune (Fig C e D).

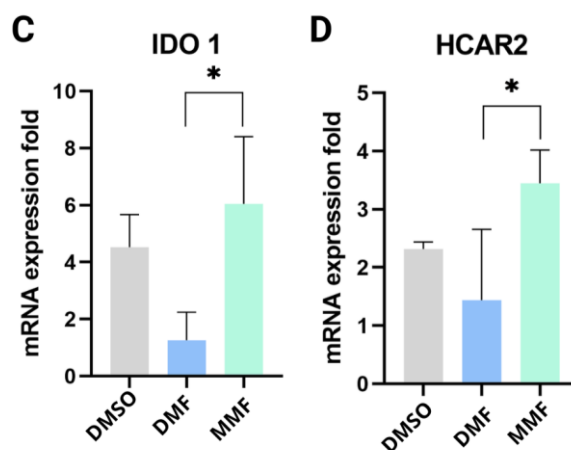


Figura C - Gráfico de barras expondo a expressão do mRNA de IDO-1 em populações de DCs tratadas com veículo, DMF e MMF; Figura D - Gráfico de barras expondo a expressão do mRNA de Hcar2 em populações de DCs tratadas com veículo, DMF e MMF.

CONCLUSÕES PARCIAIS

Temos então que o tratamento in vitro com DMF e MMF promovem a geração de DC supostamente tolerogênicas (CD11b+) que tem uma maior expressão de CD86 e MHC de classe II. Ainda, o Tratamento in vitro com MMF aumenta a expressão gênica de HCAR2 e IDO1, corroborando a hipótese de que o MMF promove a ação de DCs tolerogênicas.

Sendo assim, os próximos passos do projeto seriam fazer co-cultura de linfócitos com os diferentes subtipos de DC (CD11b+, CD11b+CD11c+, CD11c+) na presença de MOG, para assim avaliar a geração de células Treg e, caso os resultados dos experimentos sejam promissores, fazer a transferência adotiva de cada subtipo de DCs para animais com EAE para avaliar a evolução clínica da doença.

BIBLIOGRAFIA

(1) 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>

(2) FOX, Robert J.; MILLER, David H.; PHILLIPS, J. Theodore; HUTCHINSON, Michael; HAVRDOVA, Eva; KITA, Mariko; YANG, Minhua; RAGHUPATHI, Kartik; NOVAS, Mark; SWEETSER, Marianne T..

PlaceboControlled 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>.

(3) 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>.

(4) MUNN, David H.; MELLOR, Andrew L.. Indoleamine 2,3 dioxygenase 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>.

(5) 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>.

(6) 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>.

(7) 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>.

- (8) 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>.
- (9) 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>.
- (10) 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>.
- (11) 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>.
- (12) 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>.
- (13) HUANG, Zhe; ZAK, Jaroslav; PRATUMCHAI, Isaraphorn; SHAABANI, Namir; VARTABEDIAN, Vincent F.; NGUYEN, Nhan; WU, Tuoqi; XIAO, Changchun; TEIJARO, John R.. IL-27 promotes the expansion of self-renewing CD8+ T cells in persistent viral infection. *Journal Of Experimental Medicine*, [S.L.]California, v. 216, n. 8, p. 1791-1808, 4 jun. 2019. Rockefeller University Press. <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20190173>.
- (14) LIU, Jianguo; WANG, Qinghong; NING, Huan; HOU, Rong. Tristetraprolin regulates CD8 T cell functions and antitumor immunity through targeting IL-12 family cytokines. *The Journal Of Immunology*, [S.L.], v. 200, n. 1, p. 57.11-57.11, 1 maio 2018. The American Association of Immunologists. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.200.supp.57.11>.