

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TERAPÊUTICO DE IMUNOGLOBULINA G HUMANA EM MODELO MURINO DUPLO KNOCKOUT PARA DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE.

Bruno G. Nunes^{1*}, Flávio V. Loures², Heloísa M.S. Bueno¹, Érica B. Cangussu¹, Ernesto S.G. Guimarães¹, Giuliana C. Coatti¹, Elia G. Caldini³, Antonio C. Neto^{2**}, Mayana Zatz^{1***}

***autor-aluno / **coorientador / ***orientadora**

1. Centro de Pesquisa sobre o Genoma Humano e Células-Tronco da USP
2. Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas da USP
3. Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina da USP

Resumo:

A distrofia muscular de Duchenne é uma doença genética de herança ligada ao X recessiva, que afeta 1:3500-5000 meninos mundialmente e é causada por mutações no gene da distrofina, que codifica uma proteína cuja falta resulta em degeneração muscular e desencadeia uma resposta imune efetora intensa, com liberação de citocinas pró-inflamatórias no tecido.

A terapia por imunoglobulina é aprovada pela FDA nos EUA para tratar doenças autoimunes e pode modular a resposta inflamatória por uma série de mecanismos moleculares distintos.

Os animais 2KO foram divididos em grupo controle e tratado com imunoglobulina (IG) e comparados quanto às taxas de atividade, histopatologia, sobrevida, além de serem utilizados para obtenção de células para ensaios imunológicos *in vitro*.

IG foi capaz de aumentar a sobrevida e atividade dos animais, além de diminuir a inflamação muscular, a ativação das células dendríticas e a liberação de citocinas pró-inflamatórias, modulando a imunopatologia da doença.

Autorização legal:

Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (protocolo número CEUA – IBUSP 260/2016).

Palavras-chave:

Terapia IG; 2KO mdx/utr-; Duchenne

Apoio financeiro: FAPESP, CNPq, INCT

Trabalho selecionado para a JNIC pela instituição: Universidade de São Paulo (USP)

Introdução:

A distrofia muscular de Duchenne é uma doença genética neuromuscular de herança recessiva e ligada ao cromossomo X (lôcus Xp21.2), causada por mutações no gene da distrofina, que está presente no sarcolema dos músculos esqueléticos e cujo produto atua como ponte de ligação entre os filamentos de actina (citoesqueleto) e a matriz extracelular. A falta da proteína, observada nos pacientes, que geralmente morrem de complicações cardiopulmonares ao redor dos 20-25 anos de idade, faz com que a membrana plasmática que reveste as miofibras seja altamente instável e pouco resistente ¹.

Uma série de terapias vêm sendo testadas em modelos de DMD ¹⁰; no entanto, até o presente momento, apenas glicocorticoides são aprovados como método de retardo da evolução da doença, dado seu efeito imunossupressor no organismo, apesar de seu uso a longo prazo poder provocar mudanças comportamentais, hipertensão e obesidade, dentre outros sintomas, que não são tolerados por muitos pacientes.

A falta de distrofina no tecido resulta em grave degeneração muscular, com substituição de músculo por tecido conjuntivo e adiposo. Além disso, dada a instabilidade do sarcolema, ocorre liberação no meio extracelular de creatinofosfoquinase (CPK), ATP, padrões moleculares associados a danos (DAMPs) e mRNAs, o que resulta em ativação da imunidade inata por meio da interação com Toll-like Receptors e subsequente ativação da via de NF-κB, levando a um quadro de inflamação crônica no músculo, com acúmulo de citocinas pró inflamatórias, ativação de células

dendríticas e macrófagos e eventualmente uma resposta imune adaptativa mediada por linfócitos TCD8⁺ e TCD4⁺ 2.

A terapia IG vêm sendo usada em pacientes com deficiência na produção de anticorpos ou como um agente modulador em doenças autoimunes e inflamatórias. Os mecanismos de ação da terapia incluem modulação dos receptores Fc, neutralização de autoanticorpos e eliminação das anafilatoxinas C3a e C5a do sistema Complemento 3,4.

O uso da terapia resultou em dados clínicos parcialmente satisfatórios em trabalho realizado com camundongos mdx⁹, - modelos de DMD que apresentam um fenótipo bem mais leve graças a mecanismos de regeneração histológica não observados nos pacientes humanos.

O objetivo deste trabalho é analisar o potencial de IG em um modelo duplo *knock-out* para os genes da distrofina e da utrofina (de função homóloga), de fenótipo bem mais severo e, portanto, equiparável aos pacientes humanos para avaliar-se parâmetros clínicos com o uso dessa terapia.

Metodologia:

Camundongos duplo knock-out (Utrn (tm1Jrs) Dmd (MDX) / J, The Jackson Laboratory - EUA) foram divididos em dois grupos: **a)** o grupo tratado recebeu doses proporcionais ao peso (2 g de IgG por kg de camundongo) de imunoglobulina G humana via intraperitoneal e **b)** o grupo controle recebeu doses equivalentes de solução salina injetável padrão a uma concentração de 10%. Os animais foram injetados uma vez por mês, com início em 4 semanas de idade.

Ambos os grupos foram acompanhados diariamente e as taxas de sobrevivência analisadas por curvas tipo Kaplan-Meier, com o número de animais mortos de cada grupo e as suas idades sendo adequadamente calculados e incluídos nos dados para análise estatística *a posteriori*.

Para medir a taxa de atividade, o teste de esteira foi usado, começando com uma velocidade de 2 m / min e o aumento de 1 m /

min a cada minuto concluído. Há um estímulo de choque no fundo da esteira que serve de parâmetro para cessar a corrida dos animais. Ao tocar no fundo da esteira, com estímulo de choque, o animal é removido, colocado de volta em sua gaiola e seu tempo de corrida é anotado. Para cada dia de ensaio, uma simples média aritmética para cada um dos grupos é feita. Esta média é calculada pela soma dos tempos de execução individuais de cada animal dentro de um grupo naquele dia dividido pelo número total de representantes individuais

Para analisar o estado inflamatório dos camundongos, os músculos quadríceps e gastrocnêmio foram extraídos de animais 2KO tratados e controles para efeito de comparação. Para a análise histológica os músculos dos animais foram obtidos 20 dias depois de receberem a segunda injeção de imunoglobulina (2º mês) ou solução salina padrão no caso do grupo controle. Os camundongos foram eutanasiados e os músculos foram preservados em nitrogênio líquido antes da montagem das lâminas histológicas (armazenadas a -80 ° C).

Para experimentos de imunologia, foram utilizados camundongos wild-type C57BL/6 saudáveis e os camundongos afetados duplo *knockout* de ambos os grupos controle e tratado com IG (também obtidos 20 dias após a segunda dose de IG). Células dendríticas (DCs) derivadas de medula óssea foram obtidas desses 3 grupos utilizando-se rGM-CSF e IL-4⁸, sendo utilizadas para análises por citometria de fluxo e ELISA. Paralelamente, os baços de todos estes camundongos foram retirados, os linfócitos obtidos e utilizados nos experimentos de ELISA.

As análises estatísticas foram realizadas por meio do GraphPad Prism 5, por meio de teste t de Student, na comparação entre apenas 2 grupos ou ANOVA no caso de haver mais de 2 grupos envolvidos. As análises de histologia muscular foram quantificadas posteriormente por meio do software Image J e submetidas a análise estatística no Prism.

Resultados Principais e Discussão:

IG aumenta a sobrevida dos animais

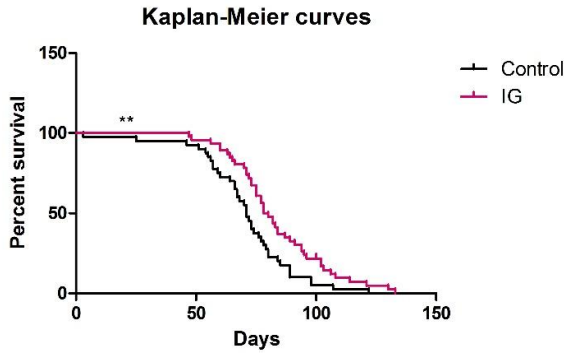


Figura 1: Curvas Kaplan-Meier mostram que a imunoglobulina aumenta a sobrevida dos camundongos 2KO tratados com IG, n=35 controles e n=45 tratados analisados quanto à porcentagem de sobrevivência, **p=0.0080.

Taxa de atividade é maior no grupo IG

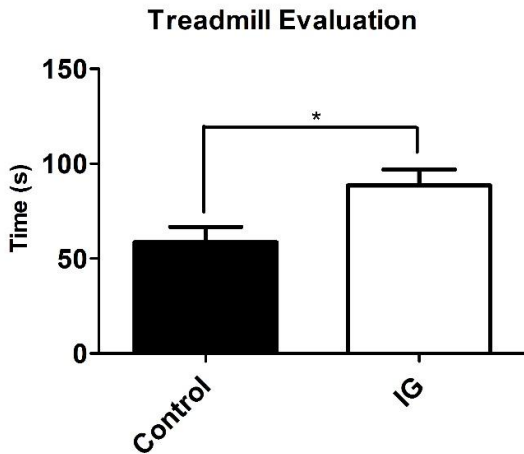


Figura 2: Teste de esteira mostrando que a média das taxas de atividade é maior no grupo IG do que no grupo controle, n=17 animais tratados com IG e n=15 animais controle; os dados são médias ± erro-padrão (SE), *p=0.0080.

A terapia IG diminui a inflamação muscular

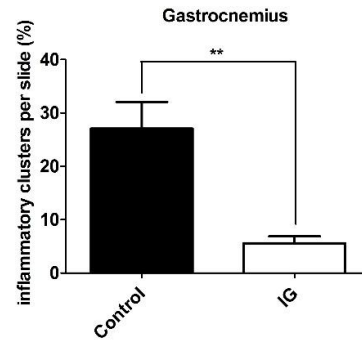
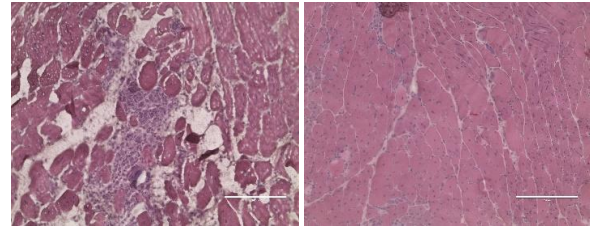


Figura 3: Análise histológica H&E mostra que imunoglobulina diminui a porcentagem de aglomerados inflamatórios no músculo gastrocnêmio (p=0.0033), o que também foi observado no quadríceps (aumento de 20x)

A terapia IG modula respostas efetoras

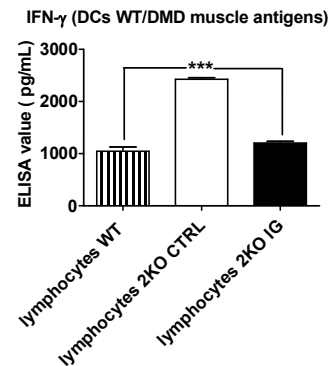
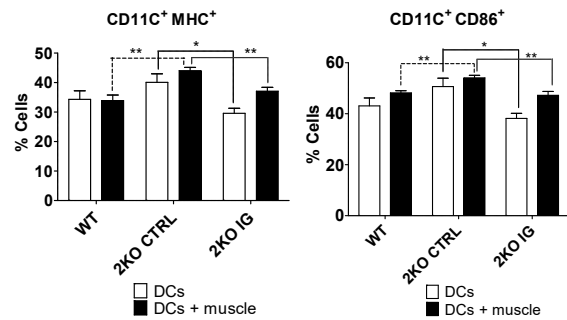


Figura 4: IG modula a imunidade inata, diminuindo a expressão de moléculas coestimulatórias nas células dendríticas e a imunidade adaptativa, diminuindo a liberação de citocinas pró-inflamatórias. A citometria de fluxo mostra diminuição na expressão de moléculas co-estimuladoras na superfície das

DCs ativadas nos grupos tratados em comparação aos controles ($p=0.0094$ para MHC⁺, $p=0.0091$ para CD86⁺). Teste de ELISA: $p < 0.0001$ para IFN- γ (mostrado na figura).

Abordagens terapêuticas recentes têm focado no aumento da expressão de distrofina por meio de terapia gênica (exon skipping therapy) ou na restauração do quadro de leitura do gene, visando a obtenção de um produto proteico parcialmente funcional nos pacientes de DMD. Não obstante, essas abordagens são aplicáveis em apenas um grupo restrito de pacientes com mutações tipo nonsense, que levam à formação de um códon de parada prematuro, quebrando o quadro de leitura do gene e os custos são extremamente elevados¹⁰. Nosso grupo demonstrou que é possível haver um músculo funcional nos modelos caninos de distrofia de Duchenne Golden-Retriever muscular dystrophy (GRMD) e Labrador (LRMD), apesar da ausência da proteína distrofina no sarcolema muscular, o que indica que outras abordagens terapêuticas não diretamente relacionadas à hiperexpressão da distrofina devam ser testadas^{5,6,7}.

Neste trabalho mostramos que a terapia IG modula a fisiopatologia da DMD, aumentando significativamente o tempo de vida dos camundongos afetados bem como sua capacidade motora. A IG parece ter um papel modulador nas respostas imunes inatas, consequentemente afetando a imunidade adaptativa, dado que foi observada uma diminuição significativa na ativação das DCs (MHC⁺, CD40⁺ e CD86⁺) em animais tratados com IG em comparação com os controles. A análise ELISA também detectou uma diminuição nas citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IFN- γ e IL-2 no grupo tratado com IG, atenuando assim a inflamação tecidual e reforçando um papel da imunoglobulina na modulação da patologia da distrofia muscular nos animais afetados.

Conclusões:

Em suma, os resultados do presente estudo podem abrir novas perspectivas para o tratamento da DMD, diminuindo a progressão do processo distrófico e aumentando a expectativa de vida dos pacientes com menos efeitos colaterais do que os glicocorticóides atualmente utilizados¹⁰ (e não tolerados por uma série de pessoas), pois consiste em anticorpos policlonais purificados de soro de doadores humanos saudáveis. Além disso, IG é

também uma terapia aprovada pela FDA já em uso para o tratamento de pacientes com doenças autoimunes, o que facilita a aprovação ética de seu uso futuro, para que possamos testá-la em nossos pacientes no Centro do Genoma da USP.

Referências Bibliográficas:

1. Guiraud S, Aartsma-Rus A, Vieira NM, et al. The Pathogenesis and Therapy of Muscular Dystrophies Annu Rev Genomics Hum. Genetics 2015; 16:281-308.
2. Rosenberg AS, Puig M, Nagaraju K, et al. Immune-mediated pathology in Duchenne muscular dystrophy. Sci Transl Med 2015; 7:299.
3. Schwab I, Nimmerjahn F. Intravenous immunoglobulin therapy: how does IgG modulate the immune system? Nat Rev Immunol 2013; 13:176-89.
4. Dalakas MC. Intravenous immunoglobulin in autoimmune neuromuscular diseases. JAMA 2004; 291:2367-75.
5. Zatz M, Vieira NM, Zucconi E, et al. A normal life without muscle dystrophin. Neuromuscul Disord 2015; 25:371-4.
6. Vieira NM, Guo LT, et al. Muscular Dystrophy in a family of Labrador Retrievers with no muscle dystrophin and a mild phenotype. Neuromuscul Disord 2015; 25:363-70.
7. Vieira NM, Elvers I, Alexander MS, et al. Jagged 1 Rescues the Duchenne Muscular Dystrophy Phenotype. Cell 2015; 163:1204-13.
8. Inaba K, Inaba M, Romani N, et al. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. J Exp Med 1992; 176:1693-702.
9. Zschüntzsch J, Zhang Y, Klinker F, et al. Treatment with human immunoglobulin G improves the early disease course in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. J Neurochem 2016; 136:351-62.
10. Nowak KJ, Davies KE. Duchenne muscular dystrophy and dystrophin: pathogenesis and opportunities for treatment. EMBO Rep 2004; 5:872-76.