

# Modelos animais para doenças neuromusculares humanas

## *Animal models for human neuromuscular diseases*

**Mariz Vainzof<sup>1</sup>, Patrícia M Kossugue<sup>1</sup>, Danielle Ayub<sup>1</sup>, Paula CG Onofre<sup>1</sup>, Dinorah Zilberztajn<sup>1</sup>, Karen Sell<sup>1</sup>, Lydia U Yamamoto<sup>1</sup>, Poliana CM Martins<sup>1</sup>, Lucas S Maia<sup>1</sup>, Mayana Zatz<sup>1</sup>, Helga CA Silva<sup>1</sup>, Maria A Miglino<sup>2</sup>, Carlos E Ambrosio<sup>2</sup>, José Xavier Neto<sup>3</sup>**

1.Centro de Estudos do Genoma Humano, IBUSP; 2.FMVZ, USP; 3.Incor, FMUSP. **Auxílio financeiro:** FAPESP-CEPID, CNPq, ABDIM.

As afecções neuromusculares humanas constituem um grupo heterogêneo de doenças genéticas caracterizadas por degeneração muscular progressiva, levando ao desenvolvimento de fraqueza muscular e perda de capacidade motora. Na última década foram identificadas mutações em vários genes, resultando na deficiência ou perda de função de diversas proteínas musculares de importância significativa para o bom funcionamento do músculo. Estudos bioquímicos e imunohistológicos têm localizado estas proteínas nos diversos compartimentos da fibra muscular. Associadas à membrana sarcolemal, encontram-se a distrofina, as 4 sarcoglicanas, disferlina e caveolina 3; na matriz extracelular, a  $\alpha 2$ -laminina e colágeno VI; nos sarcômeros, a teletonina, miotilina, titina, actina e tropomiosina; no citosol muscular, canal de Cálcio (receptor de rianodina), a calpaina 3, FRPR, TRIM32, miotubularina; e nos núcleos, a emerina, lamina A/C, proteína SMN. Algumas das doenças associadas a alterações nestas proteínas são as distrofias musculares progressivas e as miopatias congênitas.

Estudos clínicos e neurológicos em animais com fraqueza muscular têm ajudado a identificar alguns modelos animais tais como camundongos, cães e gatos, deficientes para diferentes proteínas musculares. Os estudos realizados nestes animais são cruciais para aumentar nossos conhecimentos a respeito de doenças genéticas humanas e para a investigação de terapias experimentais. A facilidade com que o genoma murino pode ser manipulado faz do camundongo uma ferramenta bastante utilizada em testes moleculares e na avaliação de complexos protéicos musculares. Dentre os modelos murinos, o camundongo

*mdx*, apresenta uma mutação de ponto no gene da distrofina, e uma ausência total da proteína no músculo, constituindo um modelo molecular e protéico para a distrofia muscular de Duchenne humana (DMD). O camundongo *dy/dy*, é o modelo murino para a distrofia muscular congênita com deficiência de  $\alpha 2$ -laminina, e apresenta fraqueza clínica significativa. Diversos camundongos transgênicos e knockout para as proteínas sarcoglicanas, caveolina e disferlina já foram gerados, e estão ajudando no estudo dos mecanismos de composição e funcionamento destes complexos protéicos nos animais afetados. Além disso, existem modelos diversos para outras doenças genéticas, tais como o modelo porcino, com mutação no gene RYR1, que apresenta os sinais clínicos observados na crise de Hipertermia Maligna.

Devido à deficiência da proteína distrofina, como em pacientes com DMD, o músculo de camundongos *mdx* é afetado por degeneração e necrose. Entretanto, o camundongo *mdx* exibe um curso clínico mais brando. Além disso, a fraqueza muscular não é característica e o tempo de vida não é reduzido. Esse camundongo também apresenta um grande número de fibras revertentes (2-3%), que passam a sintetizar novamente de forma espontânea a distrofina. Como a presença natural destas fibras dificulta a análise de terapias que visam a expressão de distrofias, outros modelos murinos de DMD foram experimentalmente induzidos. Embora o camundongo *mdx* seja um bom modelo molecular, não é um bom modelo clínico, por não apresentar fraqueza muscular significativa, dificultando o seu uso na avaliação clínica da eficácia de triagens terapêuticas. Neste sentido, a identificação do modelo canino da raça *Golden Retriever* com deficiência de distrofina trouxe novas perspectivas, uma vez que apresenta fraqueza muscular significativa, simulando a distrofia humana. A patogênese do GRMD tem manifestação *in utero* com o desenvolvimento de lesões musculares linguais. Extensas necroses dos músculos dos membros, tronco e pescoço podem ser identificadas já ao nascimento. Assim como na doença humana e no modelo *mdx*, as concentrações da enzima creatino quinase sérica estão também extremamente elevadas desde o nascimento. Em seis meses, desenvolvem-se fibrose muscular e contraturas nas junções. Além disso, cães jovens com GRMD podem também morrer por falha cardíaca ou respiratória, embora alguns sobrevivam e alcancem muitos anos de vida. Diversos estudos de terapia gênica e celular estão em andamento no modelo canino da distrofia de Duchenne.

O desenvolvimento de ferramentas moleculares possibilitou a geração de animais transgênicos que expressam a proteína *gfp*, proteína naturalmente presente em um tipo de água viva marinha. Desta forma todas as células (somáticas e tronco-embrionárias) geradas a partir destes animais expressam esta proteína, e podem ser identificadas por sua fluorescência verde. Esta é uma ferramenta poderosa no rastreamento destas células, quando injetadas em animais com doenças genéticas diversas.

A identificação e caracterização de modelos animais com deficiências musculares semelhantes às descritas nas doenças humanas constituem importante ferramenta para a avaliação fisiopatológica do respectivo defeito molecular primário. Além disso, podem ter um papel significativo como modelo bioquímico e clínico para ensaios terapêuticos. Neste sentido, estudos em andamento visam testar o potencial de diversas células-tronco adultas e embrionárias de se diferenciar nas células do tecido afetado, e produzir a proteína nele deficiente. Desta forma, espera-se que a reposição da proteína ausente ou deficiente possa corrigir o quadro decorrente do processo degenerativo.

Quanto à Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA), até o momento foram criados por técnicas de transgenia pelo menos tres modelos murinos diferentes. Duas linhagens transgênicas apresentam mutações diferentes no gene *SOD1* (G93A e G37R), e o terceiro modelo consiste em camundongo com superexpressão da proteína dinamitina, que também resulta em quadro típico de ELA. Estes modelos vem sendo utilizados em diferentes tentativas terapêuticas, dentre elas o tratamento com inibidor de ciclooxigenase-2 (COX2), superexpressão de *SOD1*, injeção de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e utilização de RNAi inibindo o alelo mutado do gene *SOD1*.

### **Referências Bibliográficas**

1. Allamand V, Campbell KP. Animal models for muscular dystrophy: valuable tools for the development of therapies. *Human Mol Genet* 2000; 9:2459-2467.
2. Barone V, Bertocchini F, Bottinelli R, Protasi F, Allen PD, Franzini Armstrong C, et al. Contractile impairment and structural alterations of skeletal muscles from knockout mice lacking type 1 and type 3 ryanodine receptors. *FEBS Lett* 1998; 422:160-164.
3. Cooper BJ, Winand NJ, Stedman H, Valentine BA, Hoffman EP, Kunkel LM, et al. The homologue of the Duchenne locus is defective in X-linked muscular dystrophy of dogs. *Nature* 1988; 334: 154-156.

4. Drachman DB, Frank K, Dykes-Hoberg M, Teismann P, Almer G, Przedborski S, et al. Cyclooxygenase 2 inhibition protects motor neurons and prolongs survival in a transgenic mouse model of ALS. *Ann. Neurol* 2002; 52: 771-778.
5. Fujii J, Otsu K, Zorzato F, de Leon S, Khanna VK, Weiler JE, et al. Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. *Science* 1991; 253: 448-451.
6. Gussoni E, Soneoka Y, Strickland CD, Buzney EA, Khan MK, Flint AF, et al. Dystrophin expression in the *mdx* mouse restored by stem cell transplantation. *Nature* 1999; 401: 390-394.
7. Pastoret C, Sebillé A. *Mdx* mice show progressive weakness and muscle deterioration with age. *J Neurol Sci* 1995; 129: 97-105.
8. Vainzof M, Yamamoto LU, Gouveia TLF, Zatz M. The contribution of protein analysis in the diagnosis of neuromuscular diseases. In: Burgess VN, Trends in Muscular Dystrophy Research. USA: Nova Publisher, 2005.
9. Wong PC, Pardo CA, Borchelt DR, Lee MK, Copeland NG, Jenkins NA, et al. An adverse property of familial ALS-linked SOD1 mutation causes motor neuron disease characterized by vacuolar degeneration of mitochondria. *Neuron* 1995; 14:1105-1116.