KÁTIA DE OLIVEIRA PIMENTA GUIMARÃES

**CORRELAÇÃO ENTRE TRANSTORNO DO ESPECTRO DO AUTISMO (TEA)
E DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE (DMD): ESTUDO DE CASOS
UTILIZANDO MODELAGEM NEURONAL**

São Paulo

2020

KÁTIA DE OLIVEIRA PIMENTA GUIMARÃES

**CORRELAÇÃO ENTRE TRANSTORNO DO ESPECTRO DO AUTISMO (TEA)
E DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE (DMD): ESTUDO DE CASOS
UTILIZANDO MODELAGEM NEURONAL**

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Anatomia dos Animais Domésticos e
Silvestres da Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo para a obtenção do título de
Doutor em Ciências

Departamento:

Cirurgia

Área de concentração:

Anatomia dos Animais Doméstico e Silvestres

Orientador:

Prof^a Dr^a Patricia Cristina Baleeiro Beltrão Braga

São Paulo

2020

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 3942
FMVZ

Guimarães, Kátia de Oliveira Pimenta
Correlação entre Transtorno do Espectro do Autismo (TEA) e Distrofia Muscular de Duchenne (DMD): estudos de casos utilizando modelagem neuronal / Kátia de Oliveira Pimenta Guimarães. – 2020.
92 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2020.

Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Cristina Baleeiro Beltrão Braga.

1. Transtorno do espectro do autismo. 2. Distrofia muscular de Duchenne. 3. iPSC. 4. Neurônios. 5. Déficit cognitivo. I. Título.

ERRATA

GUIMARÃES, K. O. P. **Correlação entre Transtorno do Espectro do Autismo (TEA) e Distrofia Muscular de Duchenne (DMD): estudo de casos utilizando modelagem neuronal.** 2020. 92 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Página	Onde se lê	Leia-se
FICHA CATALOGráfICA	Correlação entre Transtorno do Espectro do Autismo (TEA) e Distrofia Muscular de Duchenne (DMD): estudos de casos utilizando modelagem neuronal	Correlação entre Transtorno do Espectro do Autismo (TEA) e Distrofia Muscular de Duchenne (DMD): estudo de casos utilizando modelagem neuronal

São Paulo, 18 de março de 2020
CEUAX N 4698010218

Ilmo(a). Sr(a).

Responsável: Patricia Cristina Baleeiro Beltrão Braga

Área: 0

Equipe envolvida: Kátia De Oliveira Pimenta Guiimarães - **executor** (fmvz-usp); Patricia Cristina Baleeiro Beltrão Braga (orientador)

Título do projeto: "Correlação entre transtorno do espectro do autismo (TEA) e distrofia muscular de duchenne (DMD): estudo de casos utilizando modelagem neuronal".

Parecer Consubstanciado da CEUA FMVZ

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, na reunião de 27/11/2019, **ANALISOU** e **APROVOU** o protocolo de estudo acima referenciado. A partir desta data, é dever do pesquisador:

1. Comunicar toda e qualquer alteração do protocolo.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do protocolo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.
4. **Relatórios parciais** de andamento deverão ser enviados **anualmente** à CEUA até a conclusão do protocolo.

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Camilla Mota Mendes
Vice-Coordenador
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

USP - INSTITUTO DE
CIÊNCIAS BIOMÉDICAS DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Correlacao entre transtorno do espectro do autismo (TEA) e distofia muscular de Duchenne (DMD): estudo de casos utilizando modelagem neuronal

Pesquisador: Patricia Cristina Baleeiro Beltrão Braga

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 84273318.7.0000.5467

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.556.797

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 22 de Março de 2018

Assinado por:
Regina Scivoletto
(Coordenador)

Endereço: Av. Profº Lineu Prestes, 2415

Bairro: Cidade Universitária

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-7733

CEP: 05.508-000

E-mail: cep@icb.usp.br

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: GUIMARÃES, Kátia de Oliveira Pimenta

Título: **Correlação entre o transtorno do espectro do autismo (TEA) e distrofia muscular de Duchenne (DMD): estudo de casos utilizando modelagem neuronal**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutorem Ciências.

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

A Deus primeiramente por todas as oportunidades concedidas a mim, por ser meu guia e suporte sempre.

À minha família pela compreensão e apoio incansáveis, principalmente meu pai Reginaldo e minha mãe Sueli, de quem sempre ouvi “vai dar certo filha, você consegue”! Ao meu noivo Robson, e agora ao bebezinho que está crescendo e tomando conta de tudo e de todos por aqui! Amo vocês!

À Patrícia Braga, por mais uma orientação, pela confiança, suporte, e pelas oportunidades e experiências únicas que me proporcionou durante esses 6 anos de convivência.

Ao Fernando Lojudice pelo grande suporte e paciência que me ofereceu em etapas importantes deste trabalho.

Aos meus colegas de laboratório por sempre me apoiarem, por caminharem junto nessa jornada que é a pós-graduação.

Aos amigos que fiz nessa longa caminhada, só posso agradecer a vocês por cada sorriso, cada choro, cada experimento que deu errado, e depois deu errado, e depois deu errado, e às vezes deu certo...porém nos tornamos incansáveis nessa luta pela pesquisa e pelo conhecimento, e ainda de brinde levo amizades para a vida toda.

Ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres, obrigada pelos anos de trabalho e pelos ensinamentos proporcionados.

O presente trabalho foi realizado pelo período de um ano com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

GUIMARÃES, K. O. P. **Correlação entre Transtorno do Espectro do Autismo (TEA) e Distrofia Muscular de Duchenne (DMD):** estudo de casos utilizando modelagem neuronal. 2020. 92 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

O Transtorno do Espectro do Autismo (TEA) compreende um quadro complexo do neurodesenvolvimento acompanhado por prejuízos na interação social e na comunicação, com padrões restritos e estereotipados de comportamento, interesses ou atividades. A prevalência mundial é de cerca de 1-2%. A Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) é uma doença recessiva causada por uma mutação no gene da distrofina, responsável pela síntese da proteína que leva o mesmo nome e que fica localizado na região p21 do cromossomo X. Ao nascimento os pacientes portadores da DMD são aparentemente normais, com os primeiros sintomas aparecendo geralmente entre os 3 e 5 anos de idade, quando se observa fraqueza muscular e degeneração progressiva da musculatura esquelética. Há também relatos de que um terço dos pacientes apresenta algum déficit cognitivo. A prevalência é de 1 em cada 3300 meninos, e por isso é considerada uma das doenças genéticas pediátricas de maior ocorrência. Nosso grupo tem modelado o TEA e a DMD *in vitro*, através da produção de células pluripotentes induzidas de pacientes diagnosticados com essas patologias, e a posterior diferenciação destas células em células do SNC. Assim como nos autistas, identificamos que os neurônios dos pacientes com DMD apresentavam conexões neurais alteradas. Além disso, existe na literatura descrição de que 3,1% dos pacientes com DMD também apresentam sinais clínicos de autismo. Neste trabalho buscamos investigar o perfil celular de pacientes comprometidos com as duas patologias, autismo e DMD. Para tanto, produzimos iPSC de meninos de uma mesma família, para modelar os fenótipos de células do SNC, comparando com um grupo neurotípico (controle). Foi possível observar que a reprogramação para produção das iPSC a partir da coleta de células-tronco de dente decíduo foi eficiente, vantajosa e pouco estressante aos pacientes, permitindo a diferenciação em NPC e neurônio. Não

foi possível verificar diferenças morfológicas entre os portadores de TEA e DMD e os controles, entretanto, temos agora disponível materiais que nos permitirão realizar outras análises para verificar essas possíveis variações. Além disso, tivemos acesso a análises genéticas prévias realizadas pela família onde se observaram alterações em genes como SETD2 E AUTS2, porém não foi possível relacionar tais mutações genéticas ao quadro do TEA apresentado pelos trigêmeos, mas através do DNA coletado da família e essas análises genéticas prévias, poderemos realizar mais estudos acerca dessas mutações.

Palavras-chave: Transtorno do Espectro do Autismo. Distrofia Muscular de Duchenne. iPSC. Neurônios. Deficit cognitivo.

ABSTRACT

GUIMARÃES, K. O. P. **Correlation between autism spectrum disease (ASD) and Duchenne muscular dystrophy (DMD): a case study using neuronal modeling.** 2020. 92 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Autism Spectrum Disorder (ASD) comprises a complex neurodevelopmental disorder, with impairment in social interaction and communication, with restricted and stereotyped patterns of behavior, interests, or activities. The worldwide prevalence is about 1-2%. Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) is a recessive disease caused by a mutation in the dystrophin gene located in the Xp21, responsible for the synthesis of the protein that bears the same name. The prevalence of DMD is 1: 3300 boys, which is why it is considered one of the most common pediatric genetic diseases. At birth, patients with DMD are apparently healthy, with the first symptoms generally appearing between 3 and 5 years of age, when muscle weakness and progressive skeletal muscle degeneration are observed. There are also reports that one-third of patients have some cognitive impairment. Besides, there is a description in the literature that 3.1% of DMD patients also have clinical signs of autism. Our group has modeled TEA and DMD in vitro, through the production of induced pluripotent stem cells (iPSC) from patients diagnosed with these pathologies, and the subsequent differentiation of these cells into CNS cells. As with ASD, we found that the neurons of patients with DMD had altered neural connections. In this work, we seek to investigate the cell profile of patients compromised with both pathologies, ASD, and DMD, concomitantly. For this purpose, we produced iPSC from a family of triplet boys from stem cells from deciduous teeth, which were later efficiently differentiated into NPC and neuron. It was not possible to verify morphological differences in the cells of patients with ASD and DMD and the controls with the preliminary experiments presented in this thesis. However, the production of these cells allows other analyses to be carried out to verify these possible variations. Also, we had access to previous genetic analyzes carried out by the family, where changes in genes such as SETD2 and AUTS2, reported as related to ASD, were observed. However, using just these data, it

was not possible to correlate these mutations with the ASD in the triplet. Still, through the collected DNA of the family and these previous genetic analyzes, we will be able to carry out more studies.

Keywords: Autism Spectrum Disorder. Duchenne Muscular Dystrophy. iPSC. Neurons. Cognitive Deficit.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	micrograma
µL	microlitro
µm	micrômetro
BSA	do inglês " <i>Bovine Serum Albumin</i> " = albumina sérica bovina
cDNA	do inglês " <i>Complementary Desoxirribonuclei Acid</i> " = Ácido desoxirribonucleico Complementar
DAPI	4'6-diamidino-2-phenylindol
DMEM	do inglês " <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> "
EB	do inglês " <i>Embryonic Bodies</i> " = Corpos Embrióides
GAPDH	do inglês " <i>Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase</i> " = gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
iPSC	do inglês " <i>Induced Pluripotent Stem Cell</i> " = células-tronco pluripotentes induzidas
MAP2	do inglês " <i>Microtubule-associated Protein 2</i> " = proteína associada a microtúbulos
mL	mililitro
NB	Meio de crescimento neural, contendo os suplementos <u>N</u> 2 e <u>B</u> 27
NBF	Meio de crescimento neural, contendo os suplementos <u>N</u> 2, <u>B</u> 27 e b- <u>F</u> GF-2

NPC	do inglês " <i>Neural Progenitor Cells</i> " = células progenitoras neurais
OCT-4	do inglês " <i>Octamer 4</i> "
PBS	do inglês " <i>Phosphate Buffered Saline</i> " = tampão salina-fosfato
qPCR	do inglês " <i>Quantitative Polymerase Chain Reaction</i> " = reação em cadeia da polimerase
Ri	do inglês " <i>Rock inhibitor</i> " = inibidor de Rock
RNA	do inglês " <i>Ribonucleic Acid</i> " = Ácido Ribonucleico
rpm	rotações por minuto
SFB	Soro Fetal Bovino
SHED	do inglês " <i>Stem cell from Human Exfoliated Deciduous teeth</i> " = Células-tronco de dente decíduo esfoliado
SNC	Sistema Nervoso Central
SOX2	do inglês " <i>SYR (sex determining region Y) – box2</i> "

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fotomicrografia representativa da cultura das células da polpa dentária	45
Figura 2 – Fotomicrografia de células de polpa de dente dos pacientes PDA 382, PDD 11 e PDD 12, descongeladas após criopreservação	46
Figura 3 – Teste de micoplasma através da PCR das células dos pacientes	47
Figura 4 – Teste de micoplasma através da PCR das células dos pacientes	47
Figura 5 – Células de polpa dentária pós-nucleofecção em cultura sobre as iMEFs	49
Figura 6 – Fotomicrografia das colônias de iPSC	50
Figura 7 – Cariotipagem por banda-G das iPSC	51
Figura 8 – Fotomicrografia representativa dos EB produzidos a partir das iPSC	51
Figura 9 – Fotomicrografia representativa das rosetas neurais	52
Figura 10 – Fotomicrografia representativa das NPCs	53
Figura 11 – Fotomicrografia dos neurônios de dois pacientes e de um indivíduo controle	54
Figura 12 – Análise da expressão de vimentina e CD73 nas células-tronco provenientes do dente decíduo dos pacientes estudados	55
Figura 13 – Análise da expressão do marcador de pluripotência OCT-4	56
Figura 14 – Análise da expressão de nestina nas NPC	57
Figura 15 – Análise molecular por RT-PCR da expressão dos genes CD73, CD105, OCT-4 e vimentina dos trigêmeos e dos pacientes controle	58
Figura 16 – PBMCs em cultura	62
Figura 17 – Colônia de iPSC do paciente PDA 382	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Oligonucleotídeos utilizados na PCR para o teste de micoplasma	32
Tabela 2 – Anticorpos primários utilizados nos experimentos de imunofluorescência	37
Tabela 3 – Oligonucleotídeos utilizados para caracterização celular das células-tronco de polpa dentária por PCR em tempo real (qPCR)	39
Tabela 4 – Identificação dos pacientes trigêmeos estudados	44
Tabela 5 – Dados da alta hospitalar	44
Tabela 6 – Quantificação de RNA	58
Tabela 7 – Quantificação de DNA da família estudada	60
Tabela 8 – Testes genéticos realizados pela família estudada	61

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1	TRANSTORNO DO ESPECTRO DO AUTISMO	22
2.2	DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE	24
2.3	TRANSTORNO DO ESPECTRO DO AUTISMO E DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE	26
2.4	MODELAGEM DE DOENÇAS DO SISTEMA NERVOSO COM O USO DAS CÉLULAS-TRONCO PLURIPOTENTES INDUZIDAS (iPSC)	27
3	OBJETIVOS	29
3.1	OBJETIVO GERAL	29
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
4	MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1	DESCRIÇÃO DOS INDIVÍDUOS DESTE ESTUDO	30
4.2	COLETA E CULTIVO DAS CÉLULAS DE POLPA DENTÁRIA PROVENIENTES DE DENTE DECÍDUO	31
4.2.1	Análise da criopreservação das células-tronco de polpa de dente	31
4.2.2	Micoplasma	31
4.2.2.1	Teste de micoplasma por PCR	32
4.2.2.2	Tratamento das células com plasmocina	32
4.2.3	Geração de células pluripotentes induzidas a partir de células-tronco do dente decíduo esfoliado dos trigêmeos	33
4.2.3.1	Geração de iPSC a partir de células de polpa dentária por meio da nucleofecção com plasmídeos episomais	33
4.2.3.2	Cariotipagem por banda-G	34
4.2.4	Diferenciação em corpos embrióides (EB) e células progenitoras neurais (NPC) das células reprogramadas (iPSC)	34
4.2.5	Diferenciação neuronal a partir das células progenitoras neurais (NPC)	35
4.2.6	Caracterização biológica e molecular das células-tronco de polpa dentária, iPSC e NPC	35
4.2.6.1	Imunofluorescência para análise dos marcadores celulares das células-tronco de polpa dentária, iPSC e NPC	36

4.2.6.2	Caracterização molecular através de RT-PCR das células-tronco de polpa dentária	37
4.3	COLETA DE SANGUE	39
4.3.1	Extração de DNA do sangue total da família estudada	39
4.3.1.1	Quantificação do DNA	40
4.3.2	Isolamento de células mononucleares de sangue periférico (PBMCs)	41
4.3.2.1	Cultura das PBMCs	41
4.3.2.2	Transfecção das células eritróides progenitoras	42
4.3.2.3	Identificação e isolamento da colônia de iPSC	43
5	RESULTADOS	44
5.1	DESCRIÇÃO DA FAMÍLIA ESTUDADA	44
5.2	COLETA E CULTIVO DAS CÉLULAS DE POLPA DENTÁRIA	44
5.2.1	Análise do teste de micoplasma e do tratamento das células com plasmocina	45
5.2.2	Micoplasma	46
5.2.2.1	Análise do teste de micoplasma e do tratamento das células com plasmocina	46
5.2.3	Geração de iPSC a partir de células-tronco da polpa dentária	48
5.2.3.1	Geração de iPSC a partir de células-tronco de polpa dentária por meio da nucleofecção com plasmídeos episomais	48
5.2.3.2	Cariotipagem por banda-G das iPSC	50
5.2.4	Produção de corpos embrióides (EB) e células progenitoras neurais (NPC) a partir das células reprogramadas (Ipsc)	51
5.2.5	Produção de neurônios a partir das NPC dos pacientes e do indivíduo controle	53
5.2.6	Caracterização biológica e molecular	54
5.2.6.1	Análise da imunofluorescência para caracterização biológica das células-tronco de polpa dentária, iPSC e NPC	54
5.2.6.2	Análise da caracterização molecular através de RT-PCR das células-tronco de polpa dentária	57
5.3	COLETA DE SANGUE	60
5.3.1	Quantificação de DNA do sangue total e análise de dados genéticos prévios	60

5.3.1.1	Quantificação de DNA	60
5.3.1.2	Análise de dados genéticos prévios	61
5.3.2	Isolamento e cultura das células mononucleares de sangue periférico (PBMCs)	61
5.3.2.1	Identificação e isolamento da colônia de iPSC do paciente PDA 382	62
6	DISCUSSÃO	64
7	CONCLUSÃO	70
	REFERÊNCIAS	72
	APÊNDICES	86
	ANEXOS	87

1 INTRODUÇÃO

O Transtorno do Espectro do Autismo (TEA) consiste em um quadro complexo do neurodesenvolvimento onde notam-se padrões restritos de comportamento envolvendo principalmente problemas na interação social e na comunicação (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013; GEIER et al., 2012; GESCHWIND, 2011; QUAACK ET AL., 2013), cuja prevalência mundial é cerca de 1% (BROEK et al., 2014).

Quanto as causas do TEA, há um consenso mencionando a influencia de fatores genéticos e ambientais. Estudos de identificação genética em pacientes revelaram que 1089 genes podem estar implicados no TEA (SFARI GENE, 2020; GESCHWIND, 2011; SATE, LEVITT, 2011; MEFFORD et al., 2012; DE RUBEIS et al., 2014; IOSSIFOV et al., 2014). Além disso, estudos recentes mostram que há em torno de 80% de risco genético para o TEA (SANDIN S. et al., 2017, BAI D. et al., 2019). Já em relação aos fatores ambientais, estudos apontam risco para infecções na gestação, uso de medicações ou até o elevado nível de partículas poluentes no ar (GRABRUCKER, 2012; KERN et al., 2012; ZEIDAN-CHULIA et al., 2011, 2013; MOORE et al., 2000; WALDMAN et al., 2008; BERG, 2009; PALMER et al., 2009; ZEIDAN-CHULIA et al., 2014), geralmente relacionando essas interferências à mudanças epigenéticas no DNA, que poderiam levar ao TEA (SEALEYA.L. et al., 2015; MODABBERNIA A., VELTHORST E., REICHENBERG A., 2017).

A Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) é uma doença genética onde temos uma grande alteração na distrofina, proteína de grande importância no tecido muscular e no tecido nervoso, causando, portanto, um grande prejuízo nesses dois sistemas (GALAZ-VEGA et al., 2005; DAOUD et al., 2009). A partir dos 3 a 5 anos de idade já é possível verificar alterações relacionadas a degeneração muscular nos indivíduos distróficos (ANDERSON et al., 2002), sendo que a evolução da doença é progressiva, e ao longo dos anos evolui para o confinamento do paciente em uma cadeira de rodas, dependência total de terceiros, até o óbito em torno dos 20 a 30 anos de idade decorrente de insuficiência cardíaca e/ou respiratória (EMERY, 1993).

Além de toda a degeneração muscular visualizada, foi possível observar que em torno de um terço dos pacientes distróficos nota-se um importante déficit cognitivo (CYRULNIK; HINTON, 2008; PILGRAM et al., 2010), além de QI abaixo da média (ANDERSON et al., 2002), limitação na extensão verbal, na recordação histórica, e dificuldades com testes dependentes de atenção e repetição de fala (HINTON et al., 2000; 2004; 2007; CYRULNIK; HINTON, 2008). Estudos envolvendo o desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC) de crianças portadoras da DMD demonstraram alterações morfológicas nas células neuronais através de exames de imagem e exames necroscópicos (ROSMAN; KAKULAS, 1966; JAGADHA; BECKER, 1988; ITOH et al., 1999), enquanto alguns outros estudos não viram associação entre a DMD e as alterações no SNC (DUBOWITZ; CROME, 1969).

Muito vem sendo estudado a respeito do comprometimento muscular nos pacientes portadores da DMD, mas pouco se sabe sobre o comprometimento cognitivo dos mesmos e menos ainda sobre pacientes distróficos diagnosticados dentro do TEA. Apesar de precisar de mais investigação, acredita-se que a mutação no gene da distrofina gerando uma proteína alterada possa também alterar o funcionamento do SNC (WU et al., 2005), levando a associação da DMD com o TEA.

Nosso projeto visa estudar pacientes distróficos que foram diagnosticados dentro do espectro do autismo através da técnica de reprogramação celular com a produção de iPSC, a partir das células derivadas da polpa dentária (BELTRÃO-BRAGA et al., 2011), uma vez que esse tipo de técnica nos permite a diferenciação *in vitro* em diversos tipos celulares especializados, possibilitando o estudo de doenças em condições controladas para um melhor entendimento dos mecanismos biológicos envolvidos (BELTRÃO-BRAGA et al., 2013). Além disso, a técnica de reprogramação celular permite a manutenção do material genético do indivíduo, fundamental especialmente para doenças cuja genética é relevante, mas não completamente elucidada, proporcionando ainda uma plataforma personalizada para testes de fármacos (MARCHETTO et al., 2008; BELTRÃO-BRAGA et al., 2011; ROSS; ELLIS, 2010; BELTRÃO-BRAGA et al., 2013). Neste projeto, os pacientes estudados são provenientes de uma mesma família de trigêmeos, onde todos os três tem TEA e dois irmãos também DMD. O racional do projeto

está baseado na obtenção das iPSC, para posterior diferenciação em neurônios, visando entender melhor o comprometimento dessas células nos indivíduos estudados. Este recurso pode auxiliar significativamente o entendimento a respeito da alteração cognitiva observada em pacientes distróficos que também são diagnosticados dentro do espectro autista. Nossa hipótese é que a mutação na proteína distrofina pode ter influência para algum dos fenótipos encontrados no TEA, como déficit cognitivo por exemplo, ou para agravar o fenótipo do SNC quando comparado com um dos indivíduos, com o TEA, mas sem DMD.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 TRANSTORNO DO ESPECTRO DO AUTISMO

O Transtorno do Espectro do Autismo (TEA), descrito pela primeira vez por Leo Kanner (1943), compreende um quadro complexo do neurodesenvolvimento acompanhado por um importante prejuízo funcional. Os pacientes possuem uma desordem neurológica, com prejuízos na interação social e na comunicação e apresentam ainda padrões restritos e estereotipados de comportamento, interesses e atividade (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013; GESCHWIND, 2011; QUAACK ET AL., 2013). Esse quadro aparece por volta dos três anos de idade, geralmente a idade que o diagnóstico é realizado (GEIER et al., 2012). O TEA foi descrito na 5ª revisão (DSM-V) do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais como uma desordem neurológica com uma gama de prejuízos qualitativos na interação social, na comunicação, e ainda nos padrões restritos e estereotipados de atividades, comportamento e interesses (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013).

De acordo com a matéria publicada pelo Senado Federal Brasileiro em abril de 2019 pela deputada federal Carmen Zanotto, não existem dados oficiais sobre a quantidade de indivíduos dentro do espectro autista. Porém, usando o dado da prevalência mundial de 1% (BROEK et al., 2014), estima-se que haja, em média, 2 milhões de autistas no Brasil, e 70 milhões de pessoas no mundo. Segundo o último levantamento realizado pelo Centro de Controle de Doenças (CDC) nos Estados Unidos, 1 em cada 59 crianças em idade escolar são diagnosticadas com TEA (BAIO et al., 2018). Esse cenário torna o TEA um transtorno do neurodesenvolvimento com alta prevalência. Além disso, sabe-se que os meninos são quatro vezes mais afetados do que as meninas (GEIER et al., 2012).

O TEA está principalmente associado a fatores genéticos, apesar de muitos genes envolvidos ainda não serem conhecidos (GESCHWIND, 2011; SATE, LEVITT, 2011; MEFFORD et al., 2012; DE RUBEIS et al., 2014;

IOSSIFOV et al., 2014). Um importante estudo revelou 33 genes envolvidos com o autismo, onde 15 deles já eram conhecidos por estarem associados ao autismo, 11 desses genes já haviam sido relacionados com mutações em pacientes autistas, porém não foram descritos como genes de risco real por insuficiência de estudos, e 7 deles eram totalmente novos (DE RUBEIS et al., 2014). Recentemente, um estudo realizado pelo Autism Genome Project (AGP) mostrou que o número de cópias dos genes variantes, possivelmente agindo em conjunto, desempenham um papel significativo na etiologia genética desta condição (PAGNAMENTA et al., 2011). Atualmente existem cerca de 1089 genes identificados como implicados no TEA (SFARI GENE, 2020).

Além da genética, existe uma associação com fatores ambientais para o desenvolvimento e aumento da prevalência do TEA (GRABRUCKER, 2012; KERN et al., 2012; ZEIDAN-CHULIA et al., 2011, 2013; MOORE et al., 2000; WALDMAN et al., 2008; BERG, 2009; PALMER et al., 2009; ZEIDAN-CHULIA et al., 2014). O estresse oxidativo ligado ao impacto das condições ambientais pode ser ainda mais acentuado quando levamos em consideração a suscetibilidade genética (SAJDEL-SULKOWSKA et al., 2011). Dentre as justificativas para a disfunção cognitiva em crianças podemos citar os elevados níveis de partículas poluentes no ar, o que provavelmente pode causar um impacto relevante no sistema nervoso central na fase inicial da infância, danificando o córtex pré-frontal (CALDERÓN-GARCIDUEN et al., 2008; BLOCK; CALDERÓN-GARCIDUEN, 2009). O fator que melhor demonstra a relação dos fatores ambientais a déficits no desenvolvimento neurológico aumentando a prevalência do autismo é a exposição a drogas diversas, onde a toxicidade causada pelos agentes químicos é bastante estudada em doenças neurológicas crônicas e agudas (GUIZZETTI et al., 2010; LIU et al., 2010; GIBBONS et al., 2011; SCHMIDT et al., 2011; WANG et al., 2011). O ácido valpróico, um fármaco anticonvulsivo, é um bom exemplo, onde sabe-se que a exposição a este fármaco dentro do útero está associada ao fenótipo autista, tendo ainda o desenvolvimento de anormalidade anatômicas (MOORE et al., 2000).

Além da genética, estudos morfológicos e bioquímicos em cérebros pós-mortem de pacientes com TEA (FERNER, 2008; VOINEAGU et al., 2011), detectaram diversas alterações morfológicas e semelhantes às encontradas em

pacientes com síndromes relacionadas ao autismo, tais como Síndrome de Timothy e Síndrome de Rett, e ainda em modelos animais para essas mesmas síndromes (PHILLIPS, M.; POZZO-MILLER, L. 2015). Esses estudos, apesar de importantes, são limitados, pois, além de serem realizados em tecido morto e fixado impedindo pesquisas do funcionamento do tecido nervoso em tempo real, os achados estão relacionados ao estágio final da doença. A impossibilidade de estudar o cérebro vivo dos pacientes por conta da dificuldade de coleta por biópsia, por se tratar de um material extremamente delicado, limitam os estudos do funcionamento do tecido (ASSAF et al., 2010; WEE et al., 2014). Com a tecnologia das células reprogramadas, proposta neste projeto, tornou-se possível visualizar melhor as células do sistema nervoso dos pacientes, o funcionamento dessas células, e ainda observá-las vivas *in vitro*, permitindo entender melhor os mecanismos que ocorrem no TEA (ROSS P.J., ELIS J., 2010; BELTRÃO-BRAGA et al., 2013; MARCHETTO M.C. et al., 2016; RUSSO F.B. et al., 2018).

2.2 DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE

A Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) é uma das doenças genéticas pediátricas com maior ocorrência, chegando a acometer 1 a cada 3300 meninos. É uma doença recessiva que ocorre devido a mutações no gene da distrofina, responsável por sintetizar a proteína que leva o mesmo nome, localizado no cromossomo X na região p21 (GONZÁLEZ-RAMÍREZ et al., 2008; VERHAERT et al., 2011). A distrofina é uma grande proteína, que apresenta o tamanho total de 427kDa (kilodalton) (GALAZ-VEGA et al., 2005; DAOUD et al., 2009). Há três isoformas derivadas da Dp427 que são produzidas no gene por promotores tecido-específicos, e ainda expressas em regiões diferentes do corpo, tais como músculo (Dp427m), estruturas cerebrais (Dp427c) e células de Purkinje (Dp427p), e ainda outras isoformas com tamanho parcial, como a Dp260, Dp140, Dp116 e Dp71 (DAOUD et al., 2009). Os diversos sintomas relacionados à DMD são decorrentes de mutações nessas proteínas (ROBERTS, 2002; GALAZ-VEJA et al., 2005).

Ao nascimento os pacientes portadores da DMD são aparentemente normais, não se notando sinais ou sintomas. As primeiras alterações visíveis

aparecem entre os 3 e 5 anos de idade quando se observa fraqueza muscular e degeneração da musculatura esquelética (ANDERSON et al., 2002). Ainda foi possível observar que alguns pacientes distróficos apresentavam déficit cognitivo (CYRULNIK; HINTON, 2008), contando atualmente com cerca de um terço (PILGRAM et al., 2010). Por volta dos 10 anos de idade o paciente acaba confinado em uma cadeira de rodas devido à perda da habilidade motora que vai se agravando ao longo dos anos. A doença avança, os sintomas se agravam e os pacientes necessitam de um atendimento especial e da ajuda integral de terceiros. Por volta dos 20 a 30 anos de idade o paciente geralmente vem a óbito devido à insuficiência cardíaca e/ou respiratória (EMERY, 1993).

Durante a observação dos pacientes distróficos no primeiro diagnóstico clínico realizado na maioria das vezes visualiza-se o aumento da panturrilha e a fraqueza muscular progressiva (BEENAKKER et al., 2002). O diagnóstico é feito também através de exames laboratoriais, como o nível de creatinofosfoquinase (CPK), que estará aumentada nos pacientes distróficos.

A biópsia muscular é um exame importantíssimo para confirmação da DMD, onde nota-se ausência da proteína distrofina no músculo (LAING et al., 2011). São recomendados ainda para confirmação do diagnóstico, exames genéticos a fim de pesquisar onde está a mutação do gene da distrofina, tais como PCR multiplex (CHAMBERLAIN et al., 1988), MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification), array-CGH (oligonucleotide-based array comparative genomic hybridization) e sequenciamento de DNA (LAING et al., 2011).

Muitos estudos vêm sendo feitos ao longo dos anos a respeito do envolvimento do sistema nervoso central (SNC) nos pacientes portadores da DMD. A maior parte dos estudos demonstra anormalidades nesse sistema através de exame de imagem e exame necroscópico, tais como perda neuronal, gliose, perda de células de Purkinje, anormalidades dendríticas, emaranhados neurofibrilares, desarranjo na arquitetura (ROSMAN; KAKULAS, 1966; JAGADHA; BECKER, 1988; ITOH et al., 1999), pouca quantidade de distrofina nas densidades pós-sinápticas da região cortical do cérebro (KIM et al., 1995), e ainda ausência total da distrofina nos neurônios tanto no cérebro quanto no cerebelo (UCHINO et al., 1994). Em contrapartida, um estudo inicial

de 1969 não viu associação entre as anormalidades do SNC e a DMD (DUBOWITZ; CROME, 1969).

Déficit cognitivo e QI abaixo da média foram achados em meninos distróficos (ANDERSON et al., 2002), além de limitação na extensão verbal, recordação histórica, dificuldades em testes que necessitam de atenção e repetição de fala (HINTON et al., 2000; 2004; 2007; CYRULNIK; HINTON, 2008).

2.3 TRANSTORNO DO ESPECTRO DO AUTISMO E DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE

Estudos têm demonstrado a comorbidade em crianças portadoras da DMD que desenvolveram alterações comportamentais e déficit de atenção, com um importante déficit cognitivo, característicos de indivíduos com autismo (KOMOTO et al., 1984; MEHLER, 2000). Pesquisas iniciais já demonstravam um aumento na prevalência de atraso mental em pacientes portadores da DMD de 20.9%, enquanto que em indivíduos normais houve uma estimativa de 3% de atraso mental (COHEN et al., 1968). Quanto ao autismo, um estudo demonstrou a prevalência de 3.1% de 351 meninos com DMD que também se encontravam dentro do espectro do autismo, em comparação com 0.0016% de meninos da população em geral dentro do espectro do autismo (HENDRIKSEN et al., 2008), sugerindo que existe uma correlação do desenvolvimento do autismo em crianças com DMD. Outro estudo em 2009 encontrou 19% de pacientes distróficos apresentando autismo (HINTON et al., 2009).

Acredita-se que vários fatores estejam envolvidos na associação da DMD com o TEA, dentre as quais podemos citar em primeiro lugar a própria mutação no gene da distrofina gerando uma proteína truncada que seria importante para o funcionamento do SNC de uma pessoa neurotípica. O déficit na aprendizagem e até mesmo o TEA podem ser decorrentes da formação dessa proteína alterada (WU et al., 2005). Através de testes neuropsicológicos desenvolvidos por pesquisadores é possível examinar o grau de comprometimento da função cognitiva associada à DMD (D'ANGELO et al., 2011; WINGEIER et al., 2011).

Um estudo de uma família com características genótípicas e fenotípicas de autismo, com duplicação dos éxons 31-44 do gene da distrofina e também uma deleção rara dos éxons 1-9 do TRPM3, sugeriu que a mutação no gene da distrofina somada a outras mutações podem ter impacto sobre as funções do SNC, gerando o duplo diagnóstico entre distrofia muscular de Duchenne e autismo (PAGNAMENTA et al., 2011).

Apesar da literatura nos relatar que o autismo tem fatores genéticos envolvidos, os mecanismos celulares e moleculares permanecem ainda parcialmente desconhecidos e, com isso, há o interesse em entender melhor esses transtornos que vem afetando um número maior de crianças nos últimos anos.

2.4 MODELAGEM DE DOENÇAS DO SISTEMA NERVOSO COM O USO DAS CÉLULAS-TRONCO PLURIPOTENTES INDUZIDAS (IPSC)

As células-tronco pluripotentes induzidas (em inglês *induced pluripotent stem cells*, iPSC) foram desenvolvidas por Takahashi e Yamanaka em 2006, onde fibroblastos murinos de pele transformaram-se em células semelhantes as embrionárias (ES) através da expressão de quatro genes exógenos entregues por vetores retrovirais (Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc), método conhecido como reprogramação celular (TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006). O feito foi repetido em 2007 com fibroblastos humanos (TAKAHASHI et al., 2007) e devido as várias aplicações e possibilidades que o método trouxe para a pesquisa científica, Shinya Yamanaka recebeu o prêmio Nobel de Medicina em 2012. Com o sucesso desta técnica muitos problemas relacionados ao uso de células pluripotentes anteriormente enfrentados foram contornados, tais como entraves éticos por conta de células obtidas de embriões, problemas de histocompatibilidade, dentre outros (BELTRÃO-BRAGA et al., 2011). As iPSC possuem capacidade de se diferenciarem em células de qualquer um dos folhetos embrionários, possibilitando a diferenciação *in vitro* em tipos celulares especializados diversos, tornando viável o estudo de doenças em condições controladas para melhor entendimento de seus mecanismos biológicos (BELTRÃO-BRAGA et al., 2013). A grande importância no uso dessas células é que elas possuem o mesmo material genético das células originais,

possibilitando estudar aspectos biológicos e moleculares das doenças *in vitro*, ou seja, a chamada modelagem de doenças e que ainda proporciona uma plataforma para teste de fármacos (MARCHETTO et al., 2008; BELTRÃO-BRAGA et al., 2011; ROSS; ELLIS, 2010; BELTRÃO-BRAGA et al., 2013).

Protocolos a partir de iPSC têm sido aplicados para derivar neurônios personalizados de indivíduos com transtornos neurológicos sindrômicos que compartilham características autistas, como por exemplo a Síndrome de Rett (MARCHETTO et al., 2010; CHEUNG et al., 2011), Síndrome do X-Frágil (URBACH et al., 2010), Síndrome de Angelman (CHAMBERLAIN et al., 2010), Síndrome de Timothy (PASÇA et al., 2011) e Síndrome do Phelan Mc Dermid (PMDS) (SHCHEGLOVITOV et al., 2013). Estes trabalhos revelaram fenótipos neuronais específicos da doença, incluindo a conectividade sináptica disfuncional.

Deste modo, a modelagem de doenças através da tecnologia de iPSC pode contribuir muito para o melhor entendimento de patologias do sistema nervoso e, baseado nos dados da literatura, as doenças estudadas neste projeto se mostram como excelentes candidatas para essa abordagem. Além de elucidar os mecanismos do autismo associados à DMD, a tecnologia de iPSC fornece uma plataforma para teste de fármacos *in vitro*, para verificar o que melhor traria benefícios para determinado paciente, fomentando a chamada medicina personalizada.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem como objetivo investigar o fenótipo de células do SNC de meninos portadores de DMD e TEA, a fim de verificar a correlação existente entre as duas condições e seus efeitos no sistema nervoso. Para tanto, será estudada uma família de trigêmeos, todos clinicamente diagnosticados com TEA e dois meninos também portadores da DMD.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir células pluripotentes induzidas dos trigêmeos da família estudada;
- Produzir células do SNC, como progenitores neurais (NPC) e neurônios;
- Realizar a caracterização morfológica, celular e molecular das células de polpa dentária, iPSC, NPC e neurônios dos trigêmeos portadores de TEA e DMD e dos controles, e verificar se há diferenças morfológicas ou celulares entre pacientes e controles;
- Realizar a quantificação de sinapses nos neurônios derivados de iPSC dos trigêmeos portadores de TEA e DMD e dos controles, a fim de verificar se existem diferenças, que poderão ser correlacionadas com alterações no fenótipo clínico.
- Fazer uma análise genética dos trigêmeos portadores de TEA e DMD e seus pais, a fim de verificar se existem genes compatíveis com o fenótipo das patologias estudadas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 DESCRIÇÃO DOS INDIVÍDUOS DESTE ESTUDO

Para este estudo, realizamos a coleta de dois tipos de materiais biológicos: células-tronco da polpa do dente decíduo (popularmente conhecido como “dente-de-leite”) e sangue periférico. As células utilizadas nesse projeto são provenientes do biorepositório (Projeto A Fada do Dente), CEP ICB 1001, cujos dentes decíduos (popularmente conhecidos como “dentes-de-leite”) foram doados pelos pacientes e/ou responsáveis. A cultura das células-tronco de dente decíduo esfoliado (SHED) já foi previamente estabelecida, estando atualmente congelada no biorrepositório. Entretanto, para o uso do biorrepositório e para a coleta de sangue, este projeto foi submetido e aprovado pelo CEP ICB 2.556.797.

PACIENTES

Os pacientes estudados são pertencentes a uma família de trigêmeos, onde os três irmãos foram diagnosticados dentro do TEA, sendo dois deles também portadores da DMD.

Paciente 1 – PDA382 (TEA)

Paciente 2 – PDD 11 (TEA+DMD)

Paciente 3 – PDD 12 (TEA+DMD)

CONTROLES

As células utilizadas para controle dos experimentos são também provenientes do biorepositório (Projeto A Fada do Dente), CEP ICB 1001, cujos dentes foram doados e a cultura de SHED já havia sido estabelecida. Utilizamos três pacientes controles ao longo dos experimentos realizados, chamados de PD 16, PD7 e PD17. Características dos controles já foram publicadas (RUSSO et al., 2018).

4.2 COLETA E CULTIVO DAS CÉLULAS DE POLPA DENTÁRIA PROVENIENTES DE DENTE DECÍDUO

Os trigêmeos da família estudada doaram voluntariamente seus dentes de leite para o biorrepositório “Projeto a Fada do Dente” após ciência através de assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Os dentes foram doados quando de sua queda espontânea. Um meio de cultura específico foi utilizado para transporte da amostra, em temperatura de 4°C, contendo DMEM (LGC Biotecnologia, Cotia, São Paulo) com adição de 4% de antibiótico (Penicilina/Estreptomicina – Sigma, Saint Louis, USA). O material foi recebido e processado seguindo o protocolo descrito por Gronthos et al. (2000). As células foram mantidas em cultura com meio de polpa dentária contendo: 10% soro fetal bovino, 1% estreptomicina/penicilina/anfotericina (Sigma, Saint Louis, USA), 1% L-glutamina, 1% MEM-NEAA, e 87% meio DMEM/F12 (Gibco), em atmosfera úmida a 37°C com 5% CO₂.

4.2.1 Análise da criopreservação das células-tronco de polpa de dente

O processo de congelamento das células iniciou-se com a lavagem das mesmas com PBS e, em seguida, foi acrescida a enzima para o descolamento da placa de cultura celular (Tryple Express – Invitrogen, CA, USA). Posteriormente, as células foram centrifugadas durante 5 minutos a 1000rpm, ressuspensas em meio de congelamento contendo 90% de SFB (Invitrogen) e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO – LGC Biotecnologia), e os tubos contendo essas células foram conservados em freezer -80°C durante 24 horas, e então mantidos em nitrogênio líquido. Depois de, em média, 30 dias, as células foram descongeladas em banho-maria rapidamente e colocadas em cultivo para verificação da viabilidade das mesmas.

4.2.2 Micoplasma

As células de polpa de dente de todos os pacientes deste projeto foram testadas quanto a presença do micoplasma, que é uma bactéria intracelular encontrada com grande frequência na cavidade oral, e que na maioria das vezes não é percebida, a não ser pela discreta diminuição na taxa de crescimento celular das células eucarióticas (LAWRENCE et al., 2010).

4.2.2.1 Teste de Micoplasma por PCR (reação em cadeia da polimerase)

Para realização deste experimento foi realizada a coleta de 1mL do sobrenadante do meio de cultura das SHED após 48h em cultivo. Este sobrenadante foi mantido em congelamento a -20°C até o momento do teste de PCR.

O teste teve início com a centrifugação do sobrenadante por 200 x g durante 10 minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante obtido após a centrifugação foi descartado e o precipitado restante foi ressuspensionado em 15µL de água Mili-Q autoclavada.

A reação por PCR se iniciou através da utilização de 1µL do precipitado que foi ressuspensionado anteriormente, 10 µL de oligonucleotídeos sense (5'GGCGAATGGGTGAGTAACCG3') e antisense (5'CGGATAACGCTTGCGACCTATG3') que anelam em regiões homólogas de genes do Micoplasma, MgCl₂ 50Mm, 10µM dNTPs, tampão da enzima, e por último 1U de Taq DNA Polymerase (5U/µ) (Invitrogen). Para completar um volume final de 25µl foi adicionada água deionizada. Essa mistura foi colocada em termociclador, realizando a reação da seguinte maneira: 1 ciclo de 4 minutos a 94°C, 39 ciclos seguidos sendo 4 minutos a 42°C para desnaturação, 30 segundos a 60° para anelamento e 45 segundos a 72°C para polimerização, e por último 1 ciclo de 10 minutos a 72°C para a extensão final. Em seguida o material foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado com SYBR Safe DNA Stain (Invitrogen), e em seguida visualizado em transiluminador UV (Gel Doc XR, CA, USA). Para confirmação do tamanho dos fragmentos foi utilizado Gene Ruler 100pb DNA Ladder (Fermentas Life Science, NY, EUA).

Tabela 1 – Oligonucleotídeos utilizados na PCR para o teste de micoplasma.

Myco A	GGCGAATGGGTGAGTAACCG
Myco B	CGGATAACGCTTGCGACCTATG

Fonte: Guimarães, K.O.P. (2018).

4.2.2.2 Tratamento das células com Plasmocina

Uma vez confirmada a contaminação das células de polpa de dente por micoplasma iniciamos o tratamento das mesmas com a aplicação de Plasmocina (Invitrogen, CA, EUA), antibiótico específico para essa bactéria, na dose de 1µl/mL, sendo que o meio foi trocado a cada 3 dias sempre com adição da plasmocina na dose citada anteriormente. O tratamento foi realizado em um total de 6 aplicações, com acompanhamento de PCR para verificação da presença ou ausência do micoplasma.

4.2.3 Geração de células pluripotentes induzidas a partir de células-tronco de dente decíduo esfoliado dos trigêmeos

4.2.3.1 Geração de iPSC a partir de células de polpa dentária por meio da nucleofecção com plasmídeos episomais

As células-tronco de polpa dentária dos pacientes PDA382, PDD 11 e PDD 12 foram cultivadas para amplificação do número celular. Posteriormente, realizamos a contagem utilizando a câmara de Neubauer para plaqueá-las em uma placa de cultura celular contendo 6 orifícios. No primeiro experimento foram plaqueadas 1×10^5 células, e nos dois experimentos seguintes, aumentamos a quantidade de células para 2×10^5 células por poço. As células foram ressuspensas em meio de cultura de polpa dentária sem antibiótico (10% soro fetal bovino [Gemini], 1% L-glutamina [Life Technologies], 1% MEM-NEAA [Gibo], 87% meio DMEM/F12 [Gibo]).

Os plasmídeos que foram utilizados neste protocolo para a realização da nucleofecção foram os seguintes: pCE-OCT 3/4; pCE-hSK; pCE-hUL; pCE-mp53DD; pcx-EBNA (Life) e a transfecção/reprogramação foi feita em colaboração com o Dr. Fernando Lojudice, usando um nucleofector 4D (LONZA).

Após realizado o protocolo de transfecção, as células foram mantidas em cultura, em estufa a 37°C a 5% de CO₂ com o meio de cultura de polpa dentária sem antibiótico. No dia seguinte trocamos o meio, ainda com meio de cultura de polpa dentária sem antibiótico. Após 2 dias, as células reprogramadas foram cultivadas sobre uma matriz celular (*Matrigel*, BD Bioscience, CA, USA) diluído 1:250 em meio DMEM/F12 (Invitrogen) gelado,

quando então foram mantidas em cultura até o aparecimento das colônias de iPSC. Para esta fase, na primeira nucleofecção, utilizamos o meio embrionário filtrado contendo 118,5 mL DMEM/F12, 30 mL de soro KSR (Gibco), 1,5 mL de MEM-NEAA (Gibco) e 300 µL de β-mercapto etanol (Gibo). Já para as últimas duas nucleofecções, além da mistura descrita anteriormente, adicionamos 750 µL de Penicilina/Estreptomicina (LGC Biotecnologia). O meio de cultura foi trocado diariamente, e ainda adicionamos FGF-2 (*Fibroblast Growth Factor-2*, Millipore) na concentração de 1:3000 na cultura celular.

4.2.3.2 Cariotipagem por banda-G

Houve análise do cariótipo das células através da banda G. Isso foi feito nas iPSC de cada um dos pacientes trigêmeos, uma vez que para os controles isso já havia sido testado (Russo et al., 2018). As iPSC dos PDA 382, PDD 11 e PDD 12 foram plaqueadas em garrafas de 25cm³, e dois dias após seu cultivo, com troca de meio a cada 24 horas, foram enviadas para um laboratório comercial para a realização do cariótipo.

4.2.4 Diferenciação em corpos embrióides (EB) e células progenitoras neurais (NPC) derivadas das células reprogramadas (iPSC)

Conforme descrito anteriormente, as colônias de iPSC foram coletadas e plaqueadas em placas de 60mm contendo Matrigel (BD Biosciences) e mantidas em meio mTeSR (StemCell Technologies), sendo trocado a cada 24 horas. Após obter confluência de aproximadamente 80%, foi realizada a troca do meio de cultura para o meio chamado de “meio N2” composto por DMEM/F12 com 1x de N2 (Invitrogen), e ainda suplementado com 1µM de Dorsomorfina (Tocris, IO, USA) e 10µM de SB431542 (Stemgent, MA, USA). Depois de 48 horas mantidas neste meio, as colônias foram coletadas da placa e transferidas para um dos poços de uma placa de 6 poços, e mantidas em suspensão sob agitação constante a 90 rpm em placa agitadora em incubadora de CO₂ a 37°C. Essas células foram assim mantidas durante 5 dias para que houvesse a formação dos corpos embrióides (EB), sendo que o meio dessas células foi trocado uma única vez 48 horas após serem transferidas para placa

em suspensão pelo mesmo meio N2 suplementado conforme descrito anteriormente.

Em seguida os EB foram coletados e plaqueados em placa de 60mm previamente tratada com Matrigel (BD Biosciences), mantidas em meio NBF (500mL de meio DMEM/F12 suplementado com 0,5x de N2 (Invitrogen), 0,5x de B27, 1 µg/mL de Penicilina/Estreptomicina, e 20ng/mL de FGF-1 (Invitrogen) para que houvesse a produção das rosetas neurais, que são nichos de células progenitoras neurais. O meio foi trocado a cada 48 horas, e antes de cada troca a placa foi previamente lavada uma vez com PBS. Passados 7 a 10 dias após essa indução as rosetas neurais foram dissociadas, coletadas em tubo cônico de 15mL, plaqueadas em placas previamente preparadas com 10µg/mL de poli-ornitina (Invitrogen) e 2,5µg/mL de laminina (Invitrogen), e mantidas em meio NBF na composição descrita anteriormente, surgindo assim as células progenitoras neurais (NPC).

4.2.5 Diferenciação neuronal a partir das células progenitoras neurais (NPC)

Para a realização da diferenciação neuronal as NPC foram plaqueadas em placas de 24 poços previamente tratadas com poli-ornitina e laminina nas concentrações descritas anteriormente, na quantidade de 1×10^5 células por poço. Ao atingirem uma confluência aproximada de 70% o meio NBF das NPC foi removido e trocado pelo meio NB (meio NBF sem FGF) suplementado com 10µM de inibidor ROCK (Calbiochem, MA, USA), mantido por 48 horas. Passado esse tempo o meio de cultura foi trocado para meio NB e mantido por 29 dias, sendo trocado delicadamente a cada 3 ou 4 dias pelo mesmo meio NB descrito anteriormente.

4.2.6 Caracterização biológica e molecular das células-tronco de polpa dentária, iPSC e NPC

As células-tronco de polpa dentária, as células reprogramadas (iPSC) e as NPC dos pacientes estudados foram caracterizadas biologicamente, e as

células-tronco de polpa dentária foram caracterizadas molecularmente através dos ensaios e testes que serão descritos a seguir.

4.2.6.1 Imunofluorescência para análise dos marcadores celulares das células-tronco de polpa dentária, iPSC e NPC

Para as células-tronco de polpa dentária o cultivo foi feito em placa de 24 poços sob lamínula de vidro, plaqueadas na quantidade de $0,05 \times 10^6$. Ao atingirem uma confluência aproximada de 80% as células foram retiradas do cultivo. As iPSC foram cultivadas em placas de 8 poços previamente preparadas com Matrigel (BD Biosciences) até que as colônias atingissem uma confluência aproximada de 70%. As NPC foram plaqueadas e cultivadas em placas de 24 poços sob lamínula de vidro, previamente preparadas com $1 \mu\text{g/mL}$ de poli-ornitina e $5 \mu\text{g/mL}$ de laminina, e permaneceram em cultivo até atingirem a confluência média de 70%. Por fim, os neurônios foram cultivados em placas de 24 poços sob lamínula de vidro previamente preparada com poli-ornitina e laminina nas quantidades descritas acima, onde permaneceram em cultivo por 29 dias.

Em todos os tipos celulares produzidos (células-tronco de polpa dentária, iPSC, NPC, neurônios), após atingirem a confluência esperada, seguiu-se com a retirada dos meios de cultura, e as células foram tratadas através do protocolo descrito a seguir: lavagem com PBS durante 5 minutos por 3 vezes; fixação com paraformaldeído a 4% durante 15 minutos em temperatura ambiente; lavagem com PBS durante 5 minutos por 3 vezes; bloqueio em PBS com adição de 2% de soro de albumina bovina (BSA) durante 4 horas em temperatura ambiente; incubamos as células com anticorpo primário durante 16 horas a 4°C (Tabela 2).

No dia seguinte seguiu-se com o seguinte protocolo: retirada do anticorpo primário, e lavagem das células com PBS durante 5 minutos por 3 vezes; bloqueio das células com 2% de BSA diluído em PBS, durante 1 hora, sendo mantido em temperatura ambiente; adição dos anticorpos secundários AlexaFluor 488, AlexaFluor 555 e AlexaFluor 647 (Invitrogen) diluídos em PBS com 2% de BSA na concentração de 1:500 para as células-tronco de polpa dentária e 1:100 para as NPC, sendo mantidos em temperatura ambiente,

durante 1 hora, em câmara escura; lavagem das células com PBS por 3 vezes durante 5 minutos; adição de DAPI (1µg/mL) que foi mantido em temperatura ambiente em câmara escura por 5 minutos; por fim, as lâminas foram montadas com ProLong Gold (Invitrogen), e as análises de imunoreatividade foram realizadas utilizando o microscópio EVOS com fluorescência.

Tabela 2 – Anticorpos primários utilizados nos experimentos de imunofluorescência

Anticorpo	Hospedeiro	Código	Diluição	Marca
AntiVimentina	Camundongo	SC-73259	1:500	Santa Cruz
AntiCD 73	Cabra	SC-14684	1:500	Santa Cruz
AntiNestina	Camundongo	SC-33677	1:500	Santa Cruz
AntiSox 2	Cabra	SC-17320	1:100	Santa Cruz
Anti MAP 2	Galinha	Ab5392	1:100	Abcam
Anti OCT-4	Coelho	mAb2840	1:200	CellSignaling
Anti PSD 95	Camundongo	Ab18258	1:100	Abcam
AntiSinapsina	Coelho	AB1543	1:100	Milipore

Fonte: Guimarães, K.O.P. (2020).

4.2.6.2 Caracterização molecular através de RT-PCR das células-tronco de polpa dentária

Este experimento foi realizado nos 3 pacientes deste estudo e também no paciente controle, para comparação e análise dos resultados.

Para realizar a caracterização molecular iniciamos o protocolo retirando o meio das células em cultura, lavamos uma vez com PBS, acrescentamos 2 mL de tripsina às células-tronco de polpa dentária, enzima *accutase* (LGC) às NPC e neurônios para descolar as células da placa, ou fizemos a retirada manual nas iPSC, e em seguida incubamos a 37°C durante 5 minutos. Em seguida, adicionamos 4 mL de meio de cultura da célula em questão, lavando a placa com a mistura formada a fim de soltar a maior parte das células do fundo da placa. Coletamos o conteúdo e levamos à centrífuga a 1000 rpm durante 5 minutos, descartando o sobrenadante em seguida.

Para a realização da extração de RNA adicionamos 1 mL de trizol (Invitrogen) ao precipitado celular, homogeneizando o conteúdo vigorosamente, deixando em temperatura ambiente durante 5 minutos para ocorrer a dissociação completa do complexo proteico. Em seguida, adicionamos 0,2 mL de clorofórmio (Merck, Darmstadt, Alemanha) misturando vigorosamente os tubos invertendo-os por 15 segundos, e incubamos as amostras durante 2 a 3

minutos a temperatura ambiente. Levamos as amostras à centrifuga durante 15 minutos a 12000 x g a 4°C. Ao retirar as amostras visualizou-se uma fase na superfície, incolor e aquosa, o RNA, e então transferimos essa fase aquosa para um novo tubo. Iniciamos a precipitação do RNA através da adição de isopropanol 100% (Merck) à fase aquosa coletada, e misturamos o conteúdo invertendo o tubo até a obtenção de uma mistura homogênea. Incubamos a amostra durante 10 minutos em temperatura ambiente, e seguimos levamos à centrifuga a 12000 x g por 10 minutos a 4°C, onde obtêm-se a formação de um precipitado de RNA no fundo do tubo. Descartamos o sobrenadante e lavamos o precipitado com 1 mL de Etanol 75% preparado em água DEPC (dietilpirocarbonato - Invitrogen) e centrifugamos novamente a 7500 x g durante 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o tubo ficou invertido em superfície adequada para secagem do RNA durante 5 a 10 minutos, seguindo pela hidratação do RNA onde ressuspendemos o precipitado com 50 µL de água *RNAse DNase free*, mantendo as amostras no gelo, até a quantificação do RNA.

Seguimos com a realização do protocolo de cDNA utilizando uma solução contendo 1 µL de *randomhexamers* (5 ng/µL), 1 µL DNTP mix 10mM, 1 µg do RNA da amostra e água tratada com DEPC para completar um volume total de 10 µL. Essa mistura foi incubada a 65°C durante 5 minutos, e em seguida as amostras foram colocadas no gelo por pelo menos 1 minuto. Para cada amostra foi adicionado uma mistura para síntese de cDNA contendo 2 µL de “10x RT buffer”, 4 µL de “25 mM MgCl₂”, 2 µL de “0,1 M DTT”, 1 mL de “RNAse OUT” e 1 µL da enzima “Super Script III RT”. As amostras foram incubadas a 25°C durante 10 minutos, a 50°C durante 50 minutos, e por último a 85°C durante 5 minutos, e em seguida colocadas no gelo. Finalizamos adicionando 1µL de “RNAse H”, incubando as amostras a 37°C durante 20 minutos, e posteriormente armazenando-as a – 20°C até a sua utilização.

Por fim, preparamos os *primers* onde cada um contém, para cada gene, o “*forward*” e o “*reverse*”, completando a mistura com água ultrapura. Os genes utilizados estão demonstrados na tabela a seguir (Tabela 3).

Tabela 3 –Oligonucleotídeos utilizados para caracterização celular das células-tronco de polpa dentária por PCR em tempo real (qPCR).

Gene	Forward	Reverse
GAPDH	5'TGCACCACCAACTGCTTAGC3'	5'ATGGACTGTGGTCATGAG3'
Vimentina	5'GGAAGCCGAAAACACCCTG3'	5'GAGACGCATTGTCAACATCCT3'
CD 105	5'TCTGGACCACTGGAGAATAC3'	5' GAGGCATGAAGTGAGACAAT3
CD 73	5'AAGGACTGATCGAGCCACTC3'	5'GGAAGTGTATCCAACGATTCCCA3'
OCT 4	5'GACAGGGGGAGGGGAGGAGCTAGG3'	5'CTTCCCTCCAACCAGTTGCCCCAAAC3'

Fonte: Guimarães, K.O.P. (2020).

Foi utilizado GAPDH como controle interno (*house keeping gene*). Todas as análises foram feitas por quantificação absoluta, relativa ao gene de controle interno usando curvas padrão. Em seguida, os dados foram comparados e analisados no GraphPad Prisma 6 (GraphPad, CA, USA).

4.3 COLETA DE SANGUE

Foram coletados, em média, 10 mL de sangue periférico dos pais, e de 5 a 10 mL do sangue dos pacientes trigêmeos PDA 382, PDD 11 e PDD 12, em sistema *home care*, conforme escolhido pelos pais. O sangue foi transferido imediatamente para tubo heparinizado e levado ao laboratório para processamento.

Realizamos a coleta de sangue periférico dos pais e dos trigêmeos da família em questão com principal objetivo de realizar o sequenciamento genético, o que ainda não foi realizado. Pretendemos posteriormente enviar o material coletado (DNA extraído) para WES (*Whole Exome Sequence*), porém obtivemos resultados preliminares através de exames realizados previamente pela família.

Em paralelo, realizamos também a reprogramação das células mononucleares de sangue periférico.

4.3.1 Extração de DNA do sangue total da família estudada

Este protocolo foi realizado em todos os indivíduos da família estudada, sendo o pai, a mãe, e as 3 crianças trigêmeas, totalizando 5 indivíduos pertencentes à mesma família.

Para todo o processo foi utilizado o “Wizard Genomic DNA Purification Kit” (Promega), e foi realizado o protocolo em duplicata para cada paciente.

Para proceder a lise das células sanguíneas foi misturado 500 µL de sangue total com 1,5 mL da solução “Cell Lysis Solution” do kit citado acima. Misturamos a solução por inversão do tubo por aproximadamente 6 vezes, e a solução obtida foi incubada durante 10 minutos em temperatura ambiente. Em seguida centrifugamos as amostras a 2000 x g durante 10 minutos, descartamos o sobrenadante e colocamos no agitador por alguns segundos.

Seguindo o protocolo, realizamos os procedimentos para que ocorresse a lise do núcleo celular e a precipitação da proteína através da adição de 500 µL da solução “*Nuclei Lysis Solution*”, e novamente fizemos a mistura da solução por inversão do tubo por aproximadamente 6 vezes. Foi adicionado 165 µL da solução “*Protein Precipitation Solution*” e colocado no agitador por aproximadamente 20 segundos. Em seguida, centrifugamos as amostras a 2000 x g durante 10 minutos.

Para a precipitação e reidratação do DNA retiramos as amostras da centrífuga, transferimos o sobrenadante obtido para um novo tubo contendo 500 µL de isopropanol, e misturamos a solução por inversão do tubo por 6 vezes. Centrifugamos a amostra novamente a 2000 xg durante 2 minutos, seguindo com o descarte do sobrenadante e adição de 500 µL de etanol 70%. Após misturar a solução, levamos a centrífuga a 2000 x g durante 1 minuto, seguindo do descarte do sobrenadante. Deixamos o precipitado secar com o tubo invertido apoiado em superfície adequada durante aproximadamente 15 minutos. Para reidratação do DNA adicionamos ao precipitado 40 µL da solução “*DNA Rehydration Solution*” a um dos tubos de cada paciente, lavando bem o precipitado até que o mesmo soltasse do fundo, e transferimos todo o conteúdo para o segundo tubo do mesmo paciente. Adicionamos ainda 35 µL da solução “*DNA Rehydration Solution*”, e lavamos toda a mistura, totalizando por fim 75 µL da solução com o DNA da amostra por paciente, tendo, por fim, 1 tubo por paciente. Mantivemos essas amostras a 4°C, *overnight*, para que o DNA dissolvesse adequadamente.

4.3.1.1 Quantificação do DNA

A quantificação do DNA foi feita utilizando o espectrofotômetro NanoDrop (NanoDrop Technologies).

4.3.2 Isolamento de células mononucleares de sangue periférico (PBMCs)

Foi preparado um tubo cônico de 15 mL com 3 mL de Ficoll para cada paciente, sendo que este protocolo foi realizado apenas nos trigêmeos. Em seguida, cada amostra de sangue foi diluída em PBS na proporção de 1:1 e essa mistura foi despejada delicadamente no tubo preparado com Ficoll, mantendo a interface Ficoll-sangue. Os tubos foram centrifugados durante 20 minutos a 2000 rpm em temperatura ambiente com o freio da centrífuga desligado para que esta fosse parando vagarosamente. Formou-se, assim, um anel de PBMCs na interface Ficoll-sangue, que coletamos e transferimos para um novo tubo cônico de 15 mL. Lavamos as PBMCs recuperadas com PBS, e em seguida centrifugamos durante 5 minutos a 1500 rpm em temperatura ambiente, dessa vez com o freio da centrífuga ligado. Descartamos o sobrenadante e ressuspendemos o precipitado celular em PBS, centrifugando as amostras novamente durante 5 minutos a 1500 rpm com o freio ligado. Descartamos o sobrenadante novamente e ressuspendemos o precipitado de células mononucleares em 1mL de meio EPE (Meio XVIVO10 – LONZA; 1-Thioglycerol – 1M Stock Solution; Dexamethasone – 10mM Stock Solution; Erythropoietin – 100µg/mL Stock Solution; Holo-transferrin – 20 mg/mL Stock Solution; Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1) – 40 µg/mL Stock Solution; Interleukin 3 (IL-3) – 10 µg/mL Stock Solution; Stem Cell Factor (SCF) – 100 µg/mL Stock Solution; Antibióticos). Realizamos a contagem das células utilizando a câmara de Neubauer, e plaqueamos as células em uma quantidade de 3 a 5×10^7 PBMCs em meio EPE em cada poço em uma placa de 6 orifícios, e incubamos a 37°C *overnight*.

4.3.2.1 Cultura das PBMCs

No primeiro dia pós coleta das PBMCs prosseguimos realizando a transferência de todas as células não aderentes e o meio de cultura de cada poço para um novo poço na placa de 6 orifícios, mantendo o mesmo meio de cultura. Nos dias 2, 4, 6 e 8 pós coleta das PBMCs o protocolo foi seguido com a transferência das células e do meio para um tubo cônico, seguida pela centrifugação a 300 x g durante 5 minutos em temperatura ambiente e descarte

do sobrenadante, ressuspensando em seguida o precipitado celular em 2 mL de meio EPE fresco, e plaqueamos na placa de 6 orifícios, por fim incubamos a 37°C. Esse procedimento é necessário para que sejam eliminados os monócitos que ficaram aderidos na placa, e para coleta das células progenitoras eritroblastóides que ficam em suspensão.

No nono dia pós coleta das PBMCs transferimos as células para um tubo cônico e centrifugamos a 300 x g durante 5 minutos em temperatura ambiente. Nesse momento as células eritróides progenitoras estavam prontas para reprogramação.

4.3.2.2 Transfecção das células eritróides progenitoras

O protocolo de reprogramação de células eritróides foi realizado em colaboração com o Dr. Fernando Lojudice. Ao retirar as amostras da centrifuga, pós-centrifugação, descartamos o sobrenadante e ressuspendemos o precipitado celular em 1 mL de meio XVIVO10 (Lonza) e contamos as células utilizando a câmara de Neubauer. Transferimos a quantidade de 1×10^6 células por paciente e colocamos em um tubo cônico de 15 mL, e centrifugamos novamente a 300 x g durante 5 minutos. Realizamos o procedimento de transfecção (Lonza) e utilizamos os 5 vetores episomais do “Epi5 Episomal iPSC Reprogramming Kit (Life Technologies)” para a eletroporação das células com a “LonzaNucleofector”, de acordo com as recomendações do fabricante.

Em uma placa de 6 poços anteriormente tratada com matrigel, adicionamos primeiramente 1 mL de meio XVIVO10 (Lonza). Com mais 1 mL do mesmo meio lavamos a cânula onde foi realizada a transfecção, retirando todo o conteúdo para então transferi-lo para a placa de 6 poços. Homogeneizamos a placa delicadamente, e então incubamos a 37°C e 5% CO₂.

No segundo dia pós transfecção adicionamos 1 mL do meio XVIVO10 (Lonza), e nos dias 3 e 5 adicionamos 1 mL de meio mTeSR com adição dos seguintes fatores: SB, PD, Rock inhibitor e Chir. No sétimo dia pós transfecção descartamos 3 mL do meio em cultura, delicadamente, e adicionamos novamente 1 mL de meio mTeSR com os fatores descritos anteriormente. Na semana seguinte, diariamente, descartamos 1 mL do meio em cultura e

adicionamos 1 mL do meio mTeSR com os fatores, e a partir da terceira semana pós transfecção trocamos o meio todo, todos os dias, mantendo o meio mTeSR com os fatores.

Espera-se que as colônias de iPSC apareçam entre o dia 18 e o dia 25 pós transfecção.

4.3.2.3 Identificação e isolamento da colônia de iPSC

As colônias de iPSC são caracterizadas por se organizarem em grupos celulares relativamente grandes e organizados de maneira justaposta, e por apresentarem bordas bem definidas.

Ao identificarmos essas colônias as mesmas foram repicadas, transferidas para novas placas, mantidas em meio mTeSR e incubadas a 37°C.

5 RESULTADOS

5.1 DESCRIÇÃO DA FAMÍLIA ESTUDADA

Neste projeto estudamos especificamente um grupo de meninos trigêmeos diagnosticados dentro do TEA, sendo que dois desses meninos são também portadores de DMD (Tabela 4).

Tabela 4 – Identificação dos pacientes trigêmeos estudados.

Paciente	Diagnóstico	Idade
PDA 382	TEA	6 anos
PDD 11	TEA+DMD	6 anos
PDD 12	TEA+DMD	5 anos

Fonte: Guimarães, K.O.P. (2020).

Legenda: Dados dos pacientes incluindo identificação utilizada neste trabalho, diagnóstico e idade na época da coleta dos materiais biológicos (dente decíduo e sangue).

Coletamos os dados referentes ao momento de alta hospitalar após o nascimento dos trigêmeos, uma vez que são dados relevantes em pacientes que se encontram dentro do espectro autista (Tabela 5). Outros dados sobre os pacientes se encontram nos apêndices A e B.

Tabela 5 – Dados da alta hospitalar.

Paciente	PC	Peso	Estatura
PDA 382	31 cm	1920 g	44 cm
PDD 11	29 cm	1745 g	43 cm
PDD 12	29.5 cm	1625 g	41 cm

Fonte: Guimarães, K.O.P. (2020).

Legenda: PC=perímetro cefálico.

A seguir descreveremos os resultados para os dois tipos de materiais coletados, sendo primeiramente descritos os resultados adquiridos a partir das células-tronco de polpa dentária, seguido dos resultados obtidos a partir do sangue periférico coletado da família estudada.

5.2 COLETA E CULTIVO DAS CÉLULAS DE POLPA DENTÁRIA

O método de extração das células de polpa dentária foi o de digestão enzimática utilizando a Colagenase tipo I (Invitrogen). A coleta e cultura das células dos dentes dos 3 pacientes em questão ocorreu com sucesso e nos

possibilitou a expansão e armazenamento das células-tronco coletadas para experimentos posteriores.

Figura 1: Fotomicrografia representativa da cultura das células da polpa dentária.

Fonte: Guimarães, K.O.P. (2020).

Legenda: Células SHED em cultivo. A) Barra: 1000µm; B) Barra: 400µm. Imagem realizada por microscopia óptica de luz.

5.2.1 Análise da criopreservação das células-tronco de polpa dentária

Realizamos essa análise com o objetivo de verificar o potencial de criopreservação da solução utilizada, além de verificar a viabilidade e morfologia das células após o processo de descongelamento das mesmas.

Foi possível verificar que houve pouquíssima morte celular após o descongelamento, indicado na figura 2 (D, E, F) através da seta, o que nos mostrou que o método de criopreservação utilizado foi eficaz quanto a manter a viabilidade e a morfologia celular.

Figura 2 – Fotomicrografia de células de polpa de dente dos pacientes PDA 382, PDD 11 e PDD 12, descongeladas após criopreservação.

Fonte: Guimarães, K.O.P. (2018)

Legenda: Células SHED em cultivo. A, B, C) Barra: 1000µm; D, E, F) Barra: 200µm. Imagem realizada por microscopia óptica de luz. As setas vermelhas representam as células mortas suspensas no meio de cultura.

5.2.2 Micoplasma

Para a realização do teste de micoplasma mantivemos as células em cultura por 48 horas, e então coletamos uma amostra de 1 mL do meio de cultura celular para a verificação da presença do micoplasma.

5.2.2.1 Análise do teste de micoplasma e do tratamento das células com Plasmocina

Sabe-se que a presença do micoplasma na cultura celular é um grande complicador quando o objetivo final é a reprogramação dessas células. Por esse motivo, sempre investigamos a presença do micoplasma em nossas culturas celulares antes de planejar a reprogramação. Diversos colegas relatam que principalmente na etapa da diferenciação neuronal a partir da iPSC, a presença do micoplasma se torna um grande problema, uma vez que este agente dificulta essa diferenciação.

As células dos nossos pacientes foram testadas utilizando a técnica de PCR, onde foi identificada a presença do micoplasma, como podemos observar a seguir (Figura 3).

Figura 3 – Teste de micoplasma através do PCR das células dos pacientes.

Fonte: Guimarães, K.O.P. (2018).

Legenda: PCR para presença de micoplasma. Da esquerda para a direita temos: A) Marcador 100pb, B) controle positivo, C) controle negativo, D) água, E) PDA 382, F) PDD 11 e G) PDD 12. Observamos as bandas indicando a presença de micoplasma nas amostras testadas.

Uma vez identificada a presença do micoplasma nas células dos pacientes em questão iniciamos o tratamento das células com Plasmocina (Invitrogen) utilizando a concentração de 1 μ L/mL de meio celular. Realizamos a adição da Plasmocina a cada 3 dias, trocando o meio celular a cada aplicação, totalizando 6 dias de tratamento. Ao final desses dias, após um novo teste de PCR, observamos que todas as células apresentaram expressão negativa para o micoplasma como observamos a seguir (Figura 4).

Figura 4 – Teste de micoplasma através do PCR das células dos pacientes.

Fonte: Guimarães, K.O.P. (2018).

Legenda: PCR para presença de micoplasma. Da esquerda para a direita temos: A) Marcador 100pb, B) controle positivo, C) controle negativo, D) água, E) PDA 382, F) PDD 11 e G) PDD 12. Observamos a ausência das bandas, que anteriormente eram visualizadas, indicando ausência de micoplasma outeste negativo.

Após análise e comparação dos dois testes de PCR foi possível observar que o tratamento com Plasmocina em 6 administrações foi eficiente para tornar a expressão negativa para micoplasma.

5.2.3 Geração de iPSC a partir de células-tronco da polpa dentária

5.2.3.1 Geração de iPSC a partir de células-tronco de polpa dentária por meio da nucleofecção com plasmídeos episomais

Realizamos 4 nucleofecções em períodos diferentes nos 3 pacientes estudados (PDA 382, PDD 11, PDD 12) para gerar iPSC a partir das células de polpa dentária. Em todas as quatro tentativas houve sucesso no processo de nucleofecção, mas nas três primeiras tentativas não conseguimos obter iPSC ao fim do processo, e na última tentativa conseguimos obter iPSC dos três pacientes.

Na primeira tentativa de reprogramação utilizamos uma quantidade de 1×10^5 células para o processo de nucleofecção, e o meio de cultura embrionário sem antibiótico, como comumente se faz nos protocolos de reprogramação. Após a realização da primeira nucleofecção verificamos que o número de células em cultura era baixo e então realizamos uma nova nucleofecção com o dobro de células (2×10^5 células), mantendo ainda o meio de cultura embrionário sem antibiótico. Um mês após a primeira nucleofecção e 9 dias após a segunda nucleofecção as células dos dois experimentos contaminaram e foram descartadas. Realizamos então uma terceira tentativa de reprogramação utilizando 2×10^5 células para nucleofecção, e agora utilizamos o meio de cultura embrionário com antibiótico. Mesmo com a adição do antibiótico no meio de cultura as células contaminaram 15 dias após a terceira nucleofecção.

Figura 5 – Células de polpa dentária pós-nucleofecção em cultura sobre as iMEFs.

Fonte: Guimarães, K.O.P. (2018)

Legenda: I) 1ª nucleofecção dos 3 pacientes: A, B, C) Barra:400µm; D, E, F) Barra: 200µm.II) 2ª nucleofecção dos 3 pacientes: A, B, C) Barra:400µm; D, E, F) Barra: 200µm. III) 3ª nucleofecção dos 3 pacientes: A, B, C) Barra: 1000µm; D, E, F) Barra:400µm. Imagem realizada por microscopia óptica de luz. Não observamos ou não foi possível estabelecer a formação de colônias em nenhuma das três tentativas.

Na quarta e última tentativa, utilizando o mesmo protocolo, obtivemos iPSC dos três pacientes estudados, conforme a figura a seguir.

Figura 6 – Fotomicrografia das colônias de iPSC.

Fonte: Guimarães, K.O.P. (2020)

Legenda: (A) Colônias de iPSC que apresentam morfologia arredondada e com borda delimitada, característica de pluripotência. Barra: 1000µm. (B) Fotomicrografia representativa de colônia de iPSC, onde notam-se células com núcleo grande, arredondado e pouco citoplasma, características de células pluripotentes. Barra: 400 µm. Imagem realizada por microscopia óptica de luz.

5.2.3.2 Cariotipagem por banda-G das iPSC

As iPSC do presente estudo obtidas a partir das células-tronco de polpa dentária foram utilizadas para realização da cariotipagem por banda G para verificar se após os procedimentos *in vitro* de reprogramação alteraram o cariótipo celular. Utilizamos um clone por paciente para a realização deste procedimento. Dois dos pacientes estudados (PDD11 e PDD12) não apresentaram alterações no cariótipo, enquanto um dos pacientes (PDA382) apresentou uma translocação equilibrada entre os braços longos dos cromossomos 1 e 22 nas 20 metáfases analisadas (Figura 7).

Figura 7: Cariotipagem por banda-G das iPSC.

Fonte: Guimarães, K.O.P. (2020).

Legenda: iPDA382: setas apontam translocação equilibrada entre os braços longos dos cromossomos 1 e 22; iPDD11 e iPDD12 sem alterações.

5.2.4 Produção de corpos embrióides (EB) e células progenitoras neurais (NPC) a partir das células reprogramadas (iPSC)

Para produção de NPC realizamos a produção dos corpos embrióides (EB) a partir das iPSC. Os EB foram mantidos em cultura, em suspensão, durante 1 semana, quando então estavam prontos para a produção de NPC.

Figura 8: Fotomicrografia representativa dos EB produzidos a partir das iPSC.

Fonte: Guimarães, K.O.P. (2020)

Legenda: Fotomicrografia representativa dos EB cultivados em suspensão com morfologia arredondada, bem delimitada, e em variados tamanhos. (A) Barra: 1000µm. (B) Barra: 200µm. Imagem realizada por microscopia óptica de luz.

Em seguida os EB foram dissociados delicadamente e plaqueados em placas de 60mm previamente preparadas com Matrigel para então iniciar o processo de produção das rosetas neurais, que são as estruturas que posteriormente darão origem às células progenitoras neurais (NPC). O meio NBF dessas células foi trocado a cada 48 horas, e após 5 dias começamos a observar a presença das rosetas neurais (Figura 9), porém, apenas com 7 a 10 dias, realizamos a coleta dessas rosetas que foram cuidadosamente

dissociadas e transferidas para outra placa de cultura previamente preparada com poli-ornitina e laminina.

Figura 9: Fotomicrografia representativa das rosetas neurais.

Fonte: Guimarães, K.O.P. (2020)

Legenda: Fotomicrografia representativa das rosetas neurais. A) Barra: 1000 µm; B) e C) Barra: 400 µm. Imagem realizada por microscopia óptica de luz.

As NPCs obtidas a partir das rosetas neurais apresentaram morfologia estrelar, conforme esperado, onde se desenvolveram em grupos, conforme visualizado na figura 10 a seguir.

Figura 10: Fotomicrografia representativa das NPCs.

Fonte: Guimarães, K.O.P. (2020)

Legenda: Fotomicrografia representativa de NPC, apresentando morfologia estrelar. A) Barra: 1000 µm; B) Barra: 400 µm. C) Barra: 200 µm. Imagem realizada por microscopia óptica de luz.

5.2.5 Produção de neurônios a partir das NPC dos pacientes e do indivíduo controle

Após o protocolo de diferenciação neuronal durante 29 dias realizado a partir das NPCs, iniciamos o protocolo de diferenciação neuronal a partir das NPCs em todos os pacientes e no indivíduo controle do presente estudo. Entretanto, em um dos pacientes (PDD12) não foi possível concluir o processo de diferenciação uma vez que as células descolaram da placa, não resultando na produção dos neurônios (Figura 11).

Figura 11: Fotomicrografia dos neurônios.

Fonte: Guimarães, K.O.P. (2020)

Legenda: (A) Neurônios derivados de iPSC de dois dos trigêmeos do presente estudo, além de um controle. Barra: 400 µm. (B) Fotomicrografia representativa de neurônios. Barra: 100µm. (A) e (B) Notam-se alguns prolongamentos e pequenos corpos celulares. Imagem realizada por microscopia óptica de luz.

5.2.6 Caracterização biológica e molecular

5.2.6.1 Análise da imunofluorescência para caracterização biológica das células-tronco de polpa dentária, iPSC e NPC

Analizamos as células-tronco de polpa dentária dos pacientes em questão utilizando 2 marcadores: anti-CD 73 e anti-vimentina.

Figura 12 – Análise da expressão de Vimentina e CD73 nas células-tronco provenientes do dente decíduo dos pacientes estudados.

Fonte: Guimarães, K.O.P. (2018)

Legenda: Nota-se imunoreatividade para ambos os marcadores em todos os pacientes. Magnificação: 40x.

A imunoreatividade ao CD 73 e a vimentina observada nas células-tronco de polpa dentária já era esperada, uma vez que estes são marcadores para células-tronco mesenquimais, células estudadas no presente experimento.

Nas iPSC analisamos a expressão do marcador OCT-4, caracterizado por expressar pluripotência. Observamos nos 3 pacientes estudados que as colônias foram positivas (Figura 13), o que já era esperado uma vez que as iPSC são células pluripotentes.

Figura 13: Análise da expressão do marcador de pluripotência OCT-4.

Fonte: Guimarães, K.O.P. (2020).

Legenda: iPSC. Nota-se a marcação em verde para OCT-4. Barra: 200µm.

Para as NPC utilizamos os seguintes anticorpos: nestina, que é um marcador de células neurais imaturas presente no citoesqueleto das células; e SOX-2, conhecido fator de transcrição que é observado no núcleo de células-tronco e de células progenitoras (Figura 14).

Figura 14 – Análise da expressão de nestina e SOX-2 nas NPC.

Fonte: Guimarães, K.O.P. (2020)

Legenda: NPC. Nota-se a marcação em vermelho para nestina. Barra: 200 µm.

O fenótipo dos neurônios foi realizado utilizando MAP2, que é conhecido por ser marcador de microtúbulo de células neuronais, e ainda SOX-2, caracterizado por ser um fator de transcrição visualizado no núcleo tanto de células-tronco como de células progenitoras. Apesar de ter sido realizado, o protocolo provavelmente não funcionou não sendo possível verificar a fluorescência neste ensaio, que deverá ser repetido para a caracterização.

5.2.6.2 Análise da caracterização molecular através de RT-PCR das células-tronco de polpa dentária

Inicialmente realizamos a quantificação de RNA das células-tronco de polpa dentária utilizando o nanofotômetro, e obtivemos os resultados demonstrados na tabela a seguir (Tabela 6).

Tabela 6 – Quantificação de RNA.

Paciente	Quantidade	A 260 / 280	A 260 / 230
PDA 382	0,4	1,695	1,639
PDD 11	1,188	1,822	1,326
PDD 12	0,896	1,792	1,295

Fonte: Guimarães, K.O.P. (2018).

Utilizando a mesma quantidade de RNA para cada amostra estudada, realizamos a análise molecular das células-tronco de polpa dentária dos trigêmeos estudados e dos pacientes controle através do RT-PCR, comparando a expressão de genes relacionados às células-tronco mesenquimais (CD 105, CD 73, vimentina), a pluripotência (OCT 4), e ainda o gene controle (GAPDH).

Após análise entre todos os indivíduos envolvidos no estudo foi possível observar significância estatística entre os indivíduos afetados e os indivíduos do grupo controle para a expressão dos genes mesenquimais (CD 73, CD105, vimentina), enquanto que para a expressão do gene relacionado a pluripotência (OCT 4) não houve significância estatística, pois este apresenta uma expressão transiente nestas células.

Quando analisamos os indivíduos agrupados comparando o grupo afetado e o grupo controle observamos que há significância estatística para todos os genes mesenquimais (CD 73, CD 105, vimentina), e menor significância estatística para o gene relacionado ao potencial de pluripotência (OCT 4).

Figura 15 – Análise molecular por RT-PCR da expressão dos genes CD 73, CD 105, OCT-4 e vimentina dos trigêmeos e dos pacientes controle.

A

B

Fonte: Guimarães, K.O.P. (2018).

Legenda: A) Análise dos genes POR INDIVÍDUO, utilizando PD16 como controle: CD73 - **** $p < 0.0001$ para PDA 382, PDD 11 e PDD 12; CD105 - ** $p < 0.0001$ para PDA 382, **** $p < 0.0001$ para PDD 11, *** $p < 0.0001$ para PDD 12; vimentina - *** $p < 0.0001$ para PDA 382, * $p < 0.0001$ para PDD 11, ** $p < 0.0001$ para PDD 12; OCT 4 não foi significativo; análise entre os pacientes (trigêmeos): CD 73 - * $p = 0.0463$ comparando os três pacientes; os demais genes não obtiveram significância; teste de *on-way ANOVA*. B) Análise dos genes POR GRUPO (trigêmeos e controle) para cada gene estudado por teste t paramétrico (**** $p < 0.0001$ para CD73, CD105 e vimentina; * $p < 0.0343$ para OCT4).

5.3 COLETA DE SANGUE

Coletamos o sangue periférico da família estudada, e utilizamos o material coletado para extração e quantificação de DNA, onde posteriormente faremos sequenciamento genético. Para isolamento e culturas das PBMCs e isolamento de colônia de iPSC utilizamos apenas o material coletado dos trigêmeos da família em questão.

5.3.1 Quantificação de DNA do sangue total e análise de dados genéticos prévios

5.3.1.1 Quantificação de DNA

Para a quantificação de DNA foram utilizadas as amostras de sangue de toda a família, ou seja, o pai, a mãe e os trigêmeos. Para tanto, utilizamos o nanofotômetro e obtivemos os resultados descritos na tabela a seguir.

Tabela 7 – Quantificação de DNA da família estudada.

Paciente	Concentração ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	A260 / A 280 (1.8-2.0)	A 260 / A 230 (1.8-2.0)	DNA em μL (3mg total)
1	0,450	1.765	1.268	10
2	0,380	1.767	1.490	10
3	0,910	1.767	1.348	10
4	0,625	1.812	1.582	10
5	0,270	1.636	1.102	15

Fonte: Guimarães, K.O.P. (2020)

Legenda: Paciente1: pai; Paciente 2: mãe; Paciente 3: PDA 382; Paciente 4: PDD 11; Paciente 5: PDD 12.

As amostras foram armazenadas em freezer a -80°C para posteriormente realizar o sequenciamento genético de toda a família envolvida nesse estudo.

5.3.1.2 Análise de dados genéticos prévios

Através da análise de exames genéticos anteriormente realizados pela família, foi possível analisar resultados genéticos preliminares, conforme visualizamos no quadro a seguir.

Tabela 8 – Testes genéticos realizados pela família estudada.

Paciente	Exame genético
PDA382	exoma: não evidenciou alteração patogênica no gene da distrofina c.64_69+16del (NM_000109); CNV de 478pb potencialmente patogênica envolvendo o gene AUTS2 herdado do pai
PDD11	exoma: alteração patogênica no gene da distrofina (DMD), c.64_69+16del (NM_000109); identificada variante não-sinônima, c.2543C>T (NM_014159:p.A848V, gene SETD2; frequência<1%)
PDD12	exoma: alteração patogênica no gene da distrofina (DMD), c.64_69+16del (NM_000109); identificada variante não-sinônima, c.2543C>T (NM_014159:p.848V, gene SETD2; frequência<1%)
Mãe	PCR do exon 2 do gene DMD: deleção no exon 2 em um de seus alelos, que corresponde à mutação patogênica (c.64_69+16del, NM_000109) no gene DMD
Pai	exoma: CNV de 478pb potencialmente patogênica envolvendo o gene AUTS2

Fonte: Guimarães, K.O.P. (2020).

Por não termos acesso aos dados completos do sequenciamento do exoma da família estudada, enviaremos o material para WES (Whole Exome Sequence). Entretanto, é possível notar que PDD11 e PDD 12 herdaram a mutação no gene da distrofina da mãe. A mutação no gene SETD2, já identificado como de risco para o TEA, está presente no PDD 11 e PDD 12. Apesar disso, a variante encontrada nos dois meninos foi descrita como uma variante de significância clínica desconhecida (VUS, do inglês, *variant of unknown significance*). Não temos ainda informação se esta variante está presente no PDA 382 ou em um dos pais. A variante no gene AUTS2 encontrada no pai também está presente no PDA 382. Entretanto, apesar de potencialmente patogênica, não é possível dizer apenas com estes exames preliminares se esta mutação poderia ser a responsável pelo fenótipo TEA do paciente 382 uma vez que o pai apresenta a mesma mutação e não se encontra diagnosticado no TEA.

5.3.2 Isolamento e cultura das células mononucleares de sangue periférico (PBMCs)

Este processo foi feito apenas nos trigêmeos da família estudada.

Após realizarmos o processo de isolamento das PBMCs do sangue dos pacientes obtivemos células apenas de dois dos três pacientes (PDA 382 e PDD 12), conforme podemos visualizar na figura 18. Em um deles (PDD 11), após a contagem das células, não havia quantidade suficiente de células para manter em cultura.

Figura 16 – PBMCs em cultura.

Fonte: Guimarães, K.O.P. (2020).

Legenda: PBMCs em cultura. A, B) Barra: 1000µm; C, D) Barra: 400µm.

5.3.2.1 Identificação e isolamento da colônia de iPSC do paciente PDA382

Depois de realizado o processo de transfecção das PBMCs de dois dos trigêmeos (PDA 382 e PDD 12) mantivemos as células em cultura e após 40 dias foi realizada a coleta de uma colônia de iPSC do paciente PDA 382 (figura 19), que posteriormente foi expandida e congelada. As células do paciente PDD 12 continuaram em cultura por mais 10 dias e, como não foi observado o aparecimento de colônia de iPSC, a placa foi descartada.

Figura 17 – colônia de iPSC do paciente PDA 382.

Fonte: Guimarães, K.O.P. (2018).

Legenda: Nota-se colônia de iPSC apontada pela seta vermelha. Barra: 400μm.

O método de reprogramação a partir das PBMCs não se mostrou eficaz nos nossos pacientes e, portanto, não foi continuado.

6 DISCUSSÃO

A distrofina é uma proteína importante localizada no citoesqueleto do sarcolema das células musculares dos músculos esqueléticos, que se associa a outras proteínas transmembrânicas, formando um complexo de proteínas que fazem a manutenção da fisiologia e da estrutura normal das fibras musculares (DRAVIAM et al., 2001). Sabemos ainda que a distrofina está presente em tecidos como a retina, fígado, coração e sistema nervoso central (SNC) (DAOUD et al., 2009), e que mutações no gene que codifica a distrofina podem causar diversas alterações no organismo, levando a doenças genéticas, tais como a distrofia muscular de Duchenne (DMD) (GONZÁLEZ-RAMÍREZ et al., 2008; VERHAERT et al., 2011).

Os efeitos da ausência da distrofina na musculatura esquelética têm sido muito estudados na DMD, porém pouco se sabe sobre os efeitos de sua ausência no SNC. Alguns estudos foram realizados em tecidos de SNC post-mortem (DUBOWITZ; CROME, 1969) e em modelos animais (DAOUD ET al., 2009), mas ainda insuficientes para o entendimento da patologia da DMD no SNC. Estudos realizados ao longo dos últimos anos com pacientes distróficos demonstraram que uma parte dos pacientes apresentam déficit cognitivo, QI abaixo da média (ANDERSON ET al., 2002), alterações comportamentais e déficit de atenção, características compatíveis com transtorno do espectro autista (TEA) (KOMOTO et al., 1984; MEHLER, 2000).

Sabendo da correlação entre DMD e TEA, nosso trabalho buscou correlacionar esses distúrbios, visto que tivemos acesso a uma família cujos indivíduos apresentam as duas patologias. A abordagem metodológica escolhida foi a modelagem de doenças através da reprogramação celular, produzindo inicialmente células iPSC para sua posterior diferenciação em células do SNC. Em nosso entendimento, a abordagem utilizada parece adequada e vantajosa em relação aos estudos com cérebros post-mortem ou animais, pois permite o uso de células humanas vivas *in vitro* e mantém o *background* genético dos pacientes, possibilitando ainda seu uso como uma plataforma de testes para fármacos de forma personalizada (MARCHETTO et al., 2008; BELTRÃO-BRAGA et al., 2011; ROSS, ELLIS, 2010; BELTRÃO-BRAGA et al., 2013). Por fim, o uso de iPSC permite a diferenciação em vários

tipos celulares, como neurônios, que seriam alvos deste estudo, possivelmente mimetizando o que ocorre no SNC dos pacientes estudados (RUSSO et al., 2018). Além disso, de maneira mais geral, o uso de células embrionárias permite a diferenciação em vários tipos celulares, mas as iPSC, além de manterem essa habilidade, não causam os problemas éticos encontrados para o uso de células obtidas de embrião, nem tampouco causariam problemas de histocompatibilidade no caso de uma terapia celular (BELTRÃO-BRAGA et al., 2011; BELTRÃO-BRAGA et al., 2013).

As células-alvo para reprogramação no nosso estudo foram derivadas da polpa de dentes decíduos (Figura 1). A coleta dessas células se mostra pouco invasiva, pode ser feita em casa sem causar stress adicional, como em outros tipos de coleta, o que é muito importante devido a dificuldade de interação social observada nos indivíduos com TEA. As células da polpa dentária possuem ainda outras vantagens para este projeto, como uma boa viabilidade após criopreservação (Figura 2), permitindo que possam ser congeladas e descongeladas quando necessárias, não necessitando de novas coletas de amostras biológicas; e têm a mesma origem embrionária ectodérmica que as células neuronais dos pacientes, que são nosso alvo ao final deste estudo (ARORA, ARORA, MUNSHI, 2009; HUANG et al., 2010; MA et al., 2012, EVANGELINELLIS et al., 2014; DIDILESCU et al., 2013; KAUKUA et al., 2014; BELTRÃO-BRAGA et al., 2011).

Após a coleta e cultivo do material obtivemos células-tronco mesenquimais caracterizadas por aderir ao plástico, com núcleo centralizado e citoplasma alongado, características esperadas para qualquer célula-tronco mesenquimal (Figura 1) (DOMINICI et al., 2006). Detectamos ainda a presença de micoplasma nas nossas células-tronco provenientes de dente decíduo (Figura 3), o que é muito comum por ser uma bactéria intracelular frequentemente encontrada na mucosa oral normal, região onde encontramos o dente decíduo. Consideramos esse fato uma desvantagem na utilização das células-tronco de dente decíduo, uma vez que a presença de micoplasma nessas células dificulta a reprogramação e prejudica a diferenciação celular (SANTOSTEFANO et al., 2015). Por esse motivo, antes de iniciar o processo de reprogramação celular, tratamos as nossas células utilizando a Plasmocina (UPHOFF, C.C.; DENKMANN, S.A.; DREXLER, S.A., 2012), até a detecção

negativa do micoplasma utilizando a técnica de PCR (Figura 4). Após a confirmação do resultado negativo utilizando a técnica de PCR, foi possível realizar a reprogramação e diferenciação celular.

Na sequência iniciamos a reprogramação das células-tronco através da nucleofecção utilizando plasmídeos episomais, onde realizamos um total de quatro tentativas. Na primeira tentativa o processo de reprogramação não teve sucesso, provavelmente relacionado ao número de células que foi utilizado, já que por conta do “choque elétrico” para a transfecção há uma quantidade de células que pode entrar em sofrimento e consequentemente morte. Considerando isto, e que *per se* a eficiência da reprogramação celular é muito baixa, acreditamos que se aumentássemos o número de células nas transfecções seguintes poderíamos obter algum sucesso. Sendo assim, na segunda e terceira tentativas de reprogramação celular utilizamos o dobro de células em relação à primeira nucleofecção e, então, conseguimos visualizar o início da formação de colônias, mostrando que o número maior de células foi adequado para o processo de reprogramação. Porém, nesses dois processos, tivemos contaminação das colônias em cultura celular, não sendo possível a obtenção das iPSC (Figura 5).

Na quarta tentativa o processo de reprogramação foi também eficaz e conseguimos obter as colônias de iPSC dos três pacientes do presente estudo, as quais apresentaram morfologia arredondada, núcleo grande e borda bem delimitada, características esperadas nas células pluripotentes (Figura 6) (BELTRÃO-BRAGA et al., 2011).

Após o estabelecimento dos clones das colônias de iPSC, foi realizada a cariotipagem por banda-G para verificar se a reprogramação a que as células foram submetidas causou alguma alteração no cariótipo das células. As células dos três pacientes apresentaram os 46 cromossomos esperados, além de apresentarem os cromossomos sexuais XY (46, XY). Porém, o paciente PDA382 apresentou translocação equilibrada entre os braços longos dos cromossomos 1 e 22 (Figura 7).

Antes de iniciarmos o protocolo de indução da formação de progenitores neurais, realizamos a caracterização biológica por imunofenotipagem utilizando diferentes anticorpos desde as células-tronco de polpa dentária e das iPSC. As células-tronco de polpa de dente foram positivas para vimentina e CD73, assim

como descrito por outros autores que trabalharam com esses tipos celulares (DOMENICI et al., 2006; YAMAZA et al., 2010; PIVORIUNAS et al., 2010). A expressão positiva desses anticorpos caracteriza nossas células como células-tronco mesenquimais, uma vez que as suas proteínas são específicas para tecidos derivados do mesênquima (Figura 12) (DOMENICI et al., 2006). Para as células-tronco pluripotentes (iPSC) houve marcação positiva para OCT-4, o qual está envolvido na alta renovação de células-tronco embrionária indiferenciada, mostrando que a expressão positiva desse anticorpo demonstra que a célula-tronco mesenquimal voltou ao estágio inicial de célula-tronco pluripotente (Figura 13) (RANGANATHAN; LAKSHMINARAYANAN, 2012). Além da caracterização celular utilizando anticorpos, realizamos a caracterização molecular das células-tronco de polpa dentária onde obtivemos a amplificação de CD73, CD105 e vimentina, que são genes expressos em células-tronco mesenquimais, e observamos baixa expressão do gene OCT-4, o que corrobora com os dados descritos anteriormente na marcação por imunofluorescência que demonstra ser mais expresso em células pluripotentes (Figura 15).

Após a caracterização das iPSC, iniciamos o protocolo para a produção de células progenitoras neurais (NPC), que são as células-tronco presentes no cérebro (KIM et al., 2014). O protocolo então gerou inicialmente os EBs (Figura 8) e a partir dessas estruturas 3D foram produzidas as rosetas neurais (Figura 9), estruturas que teriam função semelhante aos tubos neurais durante a neurogênese para a geração de progenitores neurais (MARCHETTO et al., 2010). A partir dessas rosetas obtivemos as NPC (Figura 10). Essas NPC foram então caracterizadas com pela marcação positiva com nestina e SOX-2, expressos em células neurais imaturas (SCHWARTZ et al., 2011; SIEBZEHR et al., 2008; REINHARDT et al., 2013). Infelizmente, houve marcação apenas para nestina (Figura 14), onde não podemos afirmar qual foi o motivo da marcação com SOX-2 não ter sido eficiente. Infelizmente, devido ao prazo, não foi possível repetir esta marcação, mas considerando os resultados para nestina, a morfologia das NPC, podemos afirmar que o protocolo foi eficiente e houve a produção de NPC, reforçando dados obtidos anteriormente em nosso laboratório de que a reprogramação de células-tronco

de polpa dentária é capaz de gerar células presentes no cérebro (BELTRÃO-BRAGA et al, 2011; RUSSO et al., 2018).

A partir destas NPC, iniciamos o protocolo de diferenciação neuronal com a produção de neurônios (Figura 11). Foi possível realizar a produção dos neurônios de dois dos três pacientes do nosso estudo, além do indivíduo controle. Entretanto, infelizmente a caracterização celular dos neurônios, apesar de realizada, não funcionou adequadamente, não gerando imagens de imunofluorescência para este documento. Apesar disto, pela morfologia observada em microscopia de campo claro, é possível observar que os neurônios foram diferenciados com sucesso.

Por fim, considerada como uma das análises mais relevantes para este projeto, a quantificação das sinapses também não consta deste documento, tendo o experimento sido realizado, mas frente à dificuldade de acesso a um microscópio confocal devido a epidemia do Coronavírus (COVID19) e à recomendação de isolamento, não conseguimos acesso aos equipamentos, deixando o material guardado para análise futura tão logo possa ser realizada.

Em tempo, em nosso trabalho realizamos ainda a coleta de sangue periférico da família estudada incluindo os trigêmeos e os pais, visando fazer uma análise do tipo WES, a qual nos permitirá correlacionar a origem das alterações genéticas dos trigêmeos com os pais. Porém, a partir de exames anteriores realizados pela família e gentilmente compartilhados com nosso grupo pela mesma, foi possível observar e confirmar algumas das alterações clínicas apresentadas pelas crianças. A mutação no gene da distrofina (c.64_69+16del) dois dos pacientes (PDD 11 e PDD 12) é patogênica e foi herdada da mãe. Ainda nos mesmos pacientes há menção da alteração no gene SETD2, o qual é sabidamente relacionado a indivíduos dentro do transtorno do espectro autista (LUMISH, H.S. et al., 2015). Entretanto, no exame realizado, a mutação apontada (SETD2: c.2543C>T), é indicada como uma VUS, estando sua associação com o quadro clínico do TEA ainda incerto para esses pacientes. Em relação ao PDA 382, houve menção de alteração no gene AUTS2, uma CNV de 478 pb potencialmente patogênica que foi herdada do pai. Entretanto, neste caso também não podemos afirmar se apenas esta mutação é responsável pelo quadro do TEA uma vez que o pai a apresenta e não se encontra dentro do fenótipo do TEA. Sendo assim, por não termos

acesso aos dados brutos dos exames, os quais possibilitariam uma análise mais robusta por nosso grupo, não podemos extrapolar se existem outros genes envolvidos no fenótipo do TEA. Portanto, o material genético foi coletado por nosso grupo e será em breve analisado, infelizmente não sendo possível sua apresentação neste documento.

Para melhor aproveitamento do sangue obtido optamos por utilizar as células mononucleares do mesmo para reprogramação celular e produção de células-tronco pluripotentes induzidas (LOH Y.H. et al., 2009), uma vez que esse tipo de material pode ser obtido em qualquer fase da vida do indivíduo, diferente do que acontece com a obtenção de células-tronco através do dente decíduo, que só pode ser coletado na fase infantil. Nossos resultados demonstraram que a reprogramação a partir das células do sangue não foi tão eficiente quando comparamos com o mesmo processo realizado nas células-tronco de dente decíduo, uma vez que obtivemos apenas uma colônia de um dos três pacientes com o sangue, enquanto que com a utilização do método de nucleofecção utilizando as células-tronco de polpa dentária foi possível produzir iPSC dos três pacientes, reforçando que o melhor método de obtenção de células-tronco pluripotentes induzidas é através das células-tronco de polpa dentária, que se mostrou mais eficiente em nosso estudo, permitindo o armazenamento dessas células para estudos posteriores.

7 CONCLUSÃO

- A coleta de células-tronco a partir do dente decíduo se mostrou mais vantajosa e eficiente para a reprogramação celular do que as células sanguíneas, pois além de menos estressante e invasiva que a coleta sanguínea, permitiu que mais de uma tentativa de reprogramação fosse realizada sem novas coletas de amostra biológica, o que é especialmente importante para pacientes com dificuldades de mobilidade de interação social, objeto de estudo deste trabalho.
- As células-tronco provenientes de dente decíduo são materiais biológicos eficazes para a reprogramação utilizando plasmídeos episomais, gerando as células-tronco pluripotentes induzidas (iPSC). As iPSC derivadas de SHED produzidas anteriormente por nosso grupo foram geradas a partir de vírus (retrovírus ou vírus SENDAI recombinantes, BELTRÃO-BRAGA et al., 2011; RUSSO et al, 2018).
- Não foi possível produzir iPSC a partir de células mononucleares de sangue periférico em nosso estudo utilizando plasmídeos episomais.
- Houve geração de NPC e neurônios dos trigêmeos portadores de TEA e DMD derivados de iPSC produzidas a partir de células-tronco de dente decíduo pelo método de nucleofecção utilizando plasmídeos episomais, mas não foi possível visualizar nenhuma diferença morfológica entre as iPSC e NPC dos trigêmeos portadores de DMD e TEA e do trigêmeo portador apenas de TEA, nem mesmo quando comparados aos controles.
- Apesar de termos conseguido gerar os neurônios, não foram observadas diferenças morfológicas por microscopia óptica de campo claro entre os neurônios dos trigêmeos portadores de TEA e DMD e os controles,

sendo necessárias novas análises com marcação por imunofluorescência e posterior avaliação morfológica

- As análises genéticas realizadas com os exames prévios compartilhados pela família não nos permitem avaliar se o quadro do TEA tem relação com a mutação no gene da distrofina nos pacientes PDD 11 e PDD 12, ou se está relacionada à mutação no gene SETD2.
- As análises genéticas realizadas com os exames prévios compartilhados pela família não nos permitem avaliar se o quadro do TEA no paciente PDA 382 tem relação com a mutação no gene AUTS2 herdado do pai, ou se há outros genes relacionados com o quadro do TEA neste paciente.

REFERÊNCIAS

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION: Diagnostic criteria for autistic disorder. In: **Diagnostic and statistical manual of mental disorders. 5th ed.** Washington, D.C.: American Psychiatric Association, 2013.

ANDERSON, J.L.; HEAD, S.I.; RAE, C.; MORLEY, J.W. Brain function in Duchenne muscular dystrophy. **Brain**, v.125, p.4-13, 2002.

ASSAF, M.; JAGANNATHAN, K.; CALHOUN, V.D.; MILLER, L.; STEVENS, M.C.; SAHL, R.; O'BOYLE, J.G.; SCHULTZ, R.T.; PEARLSON, G.D. Abnormal functional connectivity of default mode sub-networks in autism spectrum disorder patients. **Neuroimage**, v.53, n.1, p.247-256, 2010.

BAI, D.; YIP, B.H.K.; WINDHAM, G.C.; SOURANDER, A.; FRANCIS, R.; YOFFE, R.; GLASSON, E.; MAHJANI, B.; SUOMINEN, A.; LEONARD, H.; GISSLER, M.; BUXBAUM, J.D.; WONG, K.; SCHENDEL, D.; KODESH, A.; BRESHNAHAN, M.; LEVINE, S.Z.; PARNER, E.T.; HANSEN, S.N.; HULTMAN, C.; REICHENBERG, A.; SANDIN, S. Association Of Genetic And Environmental Factors With Autism In A 5-Country Cohort. **JAMA Psychiatry**, v. 76, n. 10, p. 1035-1043, 2019.

BAIO, J.; WIGGINS, L.; CHRISTENSEN, D.L.; MAENNER, M.J.; DANIELS, J.; WARREN, Z.; KURZIUS-SPENCER, M.; ZAHORODNY, W.; ROSENBERG, C.R.; WHITE, T.; DURKIN, M.S.; IMM, P. NIKOLAOU, L.; YEARGIN-ALLSOPP, M.; LEE, L.C.; HARRINGTON, R.; LOPEZ, M.; FITZGERALD, R.T.; HEWITT, A.; PETTYGROVE, S.; CONSTANTINO, J.N.; VEHORN, A.; SHENOUDA, J.; HALL-LANDE, J.; BRAUN, K.V.N.; DOWLING, N.F. Prevalence of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years — Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2014. **MMWR SurveillSumm**, v. 67, n. 6, p.1–23, 2018.

BEENAKKER, E.A.C.; DE VRIES, J.; FOCKS, J.M.; VAN TOL, M.; BROUWER, O.F.; MAURITS, N.M.; VAN DER HOEVEN, J.H. Quantitative assessment of calf circumference in Duchenne muscular dystrophy patients. **Neuromuscular Disorders**, v.12, n.7, p.639-642, 2002.

BELTRAO BRAGA, P. C.; PIGNATARI, G. C.; MAIORKA, P. C.; OLIVEIRA, N. A.; LIZIER, N. F.; WENCESLAU, C. V.; MIGLINO, M. A.; MUOTRI, A. R.; KERKIS, I. Feeder-free derivation of induced pluripotent stem cells from human immature dental pulp stem cells. **Cell transplantation**, v.20, n.11-12, p.1707-19, 2011.

BELTRÃO-BRAGA, P. C. B.; PIGNATARI, G. C.; RUSSO, F. B.; FERNANDES, I. R.; MUOTRI, A. R. Disease in a dish: induced pluripotent stem cells as a novel model for developmental disorders. **Cytometry Part A**, v.83, n.1, p.11-17, 2013.

BERG, R. Autism - an environmental health issue after all? **Journal of environmental health**, v.71, n.10, p.14-18, 2009.

BLOCK, M.L.; CALDERÓN-GARCIDUENAS, L. Airpollution: mechanisms of neuroinflammation and CNS disease. **Trends Neuroscience**, v.32, p.506–516, 2009.

BLUMBERG S.J.; BRAMLETT M.D.; KOGAN M.D.; SCHIEVE L.A.; JONES J.R.; LU M.C. Changes in prevalence of parent-reported autism spectrum disorder in school-aged U.S. children: 2007 to 2011-2012. **National Health Statistics Report**, v. 65, p. 1-11, 2013.

BROEK J.A.; GUEST P.C.; RAHMOUNE H., BAHN S. Proteomic analysis of post mortem brain tissue from autism patients: evidence for opposite changes in prefrontal cortex and cerebellum in synaptic connectivity-related proteins. **Molecular Autism**, v. 5, p. 42, 2014.

CALDERÓN-GARCIDUENAS, L.; MORA-TISCARENO, A.; ONTIVEROS, E.; GÓMEZ-GARZA, G.; BARRAGÁN-MEJÍA, G.; BROADWAY, J.; CHAPMAN, S.; VALENCIA-SALAZAR, G.; JEWELLS, V.; MARONPOT, R.R.; HENRÍQUEZROLDÁN, C.; PÉREZ-GUILLÉ, B.; TORRES-JARDÓN, R.; HERRIT, L.; BROOKS, D.; OSNAYA-BRIZUELA, N.; MONROY, M. E.; GONZÁLEZ-MACIEL, A.; REYNOSOROBLES, R.; VILLAREAL-CALDERON, R.; SOLT, A. C.; ENGLE, R. W. Air pollution, cognitive deficits and brain abnormalities: a pilot study with children and dogs. **Brain and Cognition**, v.68, p.117–127, 2008.

CESNULEVICIUS K.; TIMMER M.; WESEMAN M.; THOMAS T.; BARKHAUSEN T.; GROTHE C. Nucleofection is the most efficient nonviraltransfection method for neuronal stem cells derived from ventral mesencephalic with no changes in cell composition or dopaminergic fate. **Stem Cells – Tissue-Specific Stem Cells**, v. 24, p. 2776-2791, 2016.

CHAMBERLAIN, S. J.; CHEN, P. F.; NG, K. Y.; BOURGOIS-ROCHA, F.; LEMTIRICHLIEH, F.; LEVINE, E. S.; LALANDE, M. Induced pluripotent stem cell models of the genomic imprinting disorders Angelman and Prader-Willi syndromes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of The USA**, v.107, n.41, p.17668-73, 2010.

CHAMBERLAIN, J.S.; GIBBS, R.A.; RANIER, J.E.; NGUYEN, P.N.; CASKEY, C.T. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. **Nucleic Acids Research**, v.16, n.23, p.11141-11156, 1988.

CHEUNG, A. Y.; HORVATH, L. M.; GRAFODATSKAYA, D.; PASCERI, P.; WEKSBERG, R.; HOTTA, A.; CARREL, L.; ELLIS, J. Isolation of MECP2-null Rett Syndrome patient hiPS cells and isogenic controls through X-chromosome inactivation. **Human Molecular Genetics**, v.20, n.11, p.2103-15, 2011.

COHEN H.J.; MOLNAR G.E.; TAFT L.T. The genetic relationship of progressive muscular dystrophy (Duchenne type) and mental retardation. **Developmental Medicine & Child Neurology**, v.10, n.6, p.754-765, 1968.

CYRULNIK, S.E.; HINTON, V.J. Duchenne muscular dystrophy: A cerebellar disorder? **Neuroscience and Behavioral Reviews**, v.32, p.486-496, 2008.

D'ANGELO M.G.; LORUSSO, M.L.; CIVATI, F.; COMI, G.P.; MAGRI, F.; DEL BO, R.; GUGLIERI, M.; MOLTENI, M.; TURCONI, A.C.; BRESOLIN, N. Neurocognitive profiles in Duchenne muscular dystrophy and gene mutation site. **Pediatric Neurology**, v.45, n.5, p.292-299, 2011.

DAOUD F.; CANDELARIO-MARTÍNEZ A.; BILLARD J.M.; AVITAL A.; KHENFAOUI M.; ROZENVALD Y.; GUEGAN M.; MORNET D.; JAILLARD D.; NUDEL U.; CHELLY J.; MARTÍNEZ-ROJAS D.; LAROCHE S.; YAFFE D.; VAILLEND C. Role of mental retardation-associated dystrophin-gene product Dp71 in excitatory synapse organization, synaptic plasticity and behavioral functions. **PLoS One**, v. 4, n. 8, p. 6574, 2009.

DE RUBEIS S.; HE X.; GOLDBERG A.P.; POULTNEY C.S.; SAMOCHA K.; CICEK A.E.; KOU Y.; LIU L.; FROMER M.; WALKER S.; SINGH T.; KLEI L.; KOSMICKI J.; SHIH-CHEN F.; ALEKSIC B.; BISCALDI M.; BOLTON P.F.; BROWNFELD J.M.; CAI L.; CAMPBELL N.G.; CARRACEDO A.; CHAHROUR M.H.; CHIOCCHETTI A.G.; COON H.; CRAWFORD E.L.; CURRAN S.R.; DAWSON G.; DUKETIS E.; FERNANDEZ B.A.; GALLAGHER L.; GELLER E.; GUTER S.J.; HILL R.S.; IONITA-LAZA J.; JIMENZ GONZALEZ P.; KILPINEN H.; KLAUCK S.M.; KOLEVZON A.; LEE I.; LEI I.; LEI J.; LEHTIMÄKI T.; LIN C.F.; MA'AYAN A.; MARSHALL C.R.; MCINNES A.L.; NEALE B.; OWEN M.J.; OZAKI N.; PARELLADA M.; PARR J.R.; PURCELL S.; PUURA K.; RAJAGOPALAN D.; REHNSTRÖM K.; REICHENBERG A.; SABO A.; SACHSE M.; SANDERS S.J.; SCHAFER C.; SCHULTE-RÜTHER M.; SKUSE D.; STEVENS C.; SZATMARI P.; TAMMIMIES K.; VALLADARES O.; VORAN A.; LI-SAN W.; WEISS L.A.; WILLSEY A.J.; YU T.W.; YUEN R.K.; THE DDD STUDY; HOMOZYGOSITY MAPPING COLLABORATIVE FOR AUTISM; UK10K CONSORTIUM; THE AUTISM SEQUENCING CONSORTIUM; COOK E.H.; FREITAG C.M.; GILL M.; HULTMAN C.M.; LEHNER T.; PALOTIE A.; SCHELLENBERG G.D.; SKLAR P.; STATE M.W.; SUTCLIFFE J.S.; WALSH C.A.; SCHERER S.W.; ZWICK M.E.; BARETT J.C.; CUTLER D.J.; ROEDER

K.; DEVLIN B.; DALY M.J.; BUXBAUM J.D. Synaptic, transcriptional and chromatin genes disrupted in autism. **Nature**, v. 515, n. 7526, p. 209-215, 2014.

DUBOWITZ, V.; CROME, L. The central nervous system in Duchenne muscular dystrophy. **Brain**, v.92, n.4, p.805-808, 1969.

EL-KARIM, E.A.; HAGOS, E.G.; GHALEB, A.M.; YU, B.; YANG, V.W. Kruppel-like factor 4 regulates genetic stability in mouse embryonic fibroblasts. **Molecular Cancer**, v.12, n.89, p.1-12, 2013.

EMERY, A.E. Duchenne muscular dystrophy – Meryon's disease. **Neuromuscular Disorders**, v.3, n.4, p.263-266, 1993.

FERNER, R.E. Post-mortem clinical pharmacology. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v.66, n.4, p.430-443, 2008.

GALAZ-VEGA R.; HERNÁNDEZ-KELLY L.C.; MÉNDEZ J.A.; CISNEROS B.; ORTEGA A. Glutamate regulates dystrophin-71 levels in glia cells. **Neurochemical Research**, v. 30, n. 2, p. 237-243, 2005.

GEIER D. A, KERN, J. K, GEIER, M. R. A prospective cross-sectional cohort assessment of health, physical, and behavioral problems in autism spectrum disorders. **Maedica (Buchar)**, v.7, n.3, p.193-200, 2012.

GESCHWIND D.H. Genetics of autism spectrum disorders. **Trends in Cognitive Science**, v. 15, n. 9, p. 409-416, 2011.

GIBBONS, H. M., SMITH, A. M., TEOH, H. H., BERGIN, P. M., MEE, E. W., FAULL, R. L., DRAGUNOW, M. Valproic acid induces microglial dysfunction, not apoptosis, in human glial cultures. **Neurobiology of Diseases**, v.41, n.1, p. 96-103, 2011.

GONZÁLEZ-RAMÍREZ R.; MORALES-LÁZARO S.L.; TAPIA-RAMÍREZ V.; MORNET D.; CISNEROS B. Nuclear and nuclear envelope localization of

dystrophin Dp71 and dystrophin-associated proteins (DAPs) in the C2C12 muscle cells: DAPs nuclear localization is modulated during myogenesis. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 105, n. 3, p. 735-745, 2008.

GUIZZETTI, M., MOORE, N. H., GIORDANO, G., VANDEMARK, K. L., COSTA, L. G. Ethanol inhibits neuritogenesis induced by astrocyte muscarinic receptors. **Glia**, v.58, n.12, p.1395–1406, 2010.

GRABRUCKER A.M. Environmental factors in autism. **Frontiers in Psychiatry**, v. 3, p. 118, 2012.

GRONTHOS S; MANKANI M; BRAHIM J; ROBEY PG; SHI S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, 97(25):13625-30, 2000.

HENDRIKSEN J.G.; VIES J.S. Neuropsychiatric disorders in males with Duchenne muscular dystrophy: frequency rate of attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD), autism spectrum disorder, and obsessive-compulsive disorder. **Journal of Child Neurology**, v.23, n.5. p.477-481, 2008.

HINTON, V.J.; DE VIVO, D.C.; NEREO, N.E.; GOLDSTEIN, E.; STERN, Y. Poor verbal working memory across intellectual level in boys with Duchenne dystrophy. **Neurology**, v.54, p.2127-2132, 2000.

HINTON, V.J.; DE VIVO, D.C.; FEE, R.; GOLDSTEIN, E.; STERN, Y. Investigation of poor academic achievement in children with Duchenne muscular dystrophy. **Learning Disabilities Research and Pratics**, v.19, p.146-154, 2004.

HINTON, V.J.; FEE, R. GOLDSTEIN, E.; DE VIVO, D.C. Verbal and memory skills in males with Duchenne muscular dystrophy. **Developmental Medicine and Child Neurology**, v.49, p.123-128, 2007.

HINTON, V.J.; CYRULNIK, S.E.; FEE, R.J.; BATCHELDER, A.; KIEFEL, J.M.; GOLDSTEIN, E.M.; KAUFMANN, P.; DE VIVO, D.C. Association of autistic spectrum disorders with dystrophinopathies. **Pediatric Neurology**, v.2041, n.5, p.339-346, 2009.

IOSSIFOV I.; O'ROAK B.J.; SANDERS S.J.; RONEMUS M.; KRUMM N.; LEVY D.; STESSMAN H.A.; WITHERSPOON K.T.; VIVES L.; PATTERSON K.E.; SMITH J.D.; PAEPER B.; NICKERSON D.A.; DEA J.; DONG S.; GONZALEZ L.E.; MANDELL J.D.; MANE S.M.; MURTHA M.T.; SULLIVAN C.A.; WALKER M.F.; WAQAR Z.; WEI L.; WILLSEY A.J.; YAMROM B.; LEE Y.H.; GRABOWSKA E.; DALKIC E.; WANG Z.; MARKSS.; ANDREWS P.; LEOTTA A.; KENDALL J.; HAKKER I.; ROSENBAUM J.; MA B.; RODGERS L.; TROGE J.; NARZISI G.; YOON S.; SCHATZ M.C.; MCCOMBIE W.R.; SHENDURE J.; EICHLER E.E.; STATE M.W.; WIGLER M. The contribution of de novo coding mutations to autism spectrum disorder. **Nature**, v. 515, n. 7526, p. 216-221, 2014.

ITOH, K.; JINNAI, K.; TADA, K.; HARA, K.; ITOH, H.; TAKAHASHI, K. Multifocal glial nodules in a case of Duchenne muscular dystrophy with severe mental retardation. **Neuropathology**, v.19, n.3, p.322-327, 1999.

JAGADHA, V.; BECKER, L.E. Brain morphology in Duchenne muscular dystrophy: a Golgi study. **Pediatric Neurology**, v.4, n.3, p.322-327, 1988.

KERN J.K.; GEIER D.A.; AUDHYA T.; KING P.G.; SYKES L.K.; GEIER M.R. Evidence of parallels between mercury intoxication and the brain pathology in autism. **Acta Neurobiologia e Experimentalis**, v. 72, n. 2, p. 113-153, 2012.

KIM, T.W.; WU, K.; BLACK, I.B. Deficiency of brain synaptic dystrophin in human Duchenne muscular dystrophy. **Annals of Neurology**, v.38, p.446-449, 1995.

KOMOTO, J.; USUI, S.; OTSUKI, S.; TERAOKA, A. Infantile autism and Duchenne muscular dystrophy. **Journal of autism and developmental disorders**, v.14, n.2, p.191-195, 1984.

LAING, N.G.; DAVIS, M.R.; BAYLEY, K.; FLETCHER, S.; WILTON, S.D. Molecular diagnosis of Duchenne muscular dystrophy: past, present and future in relation to implementing therapies. **The Clinical Biochemist Reviews**, v.32, n.3, p.129, 2011.

LAWRENCE B; BASHIRI H; DEHGHANI H. Cross comparison of rapid mycoplasma detection platforms. **Biologicals**, 38(2):218-23, 2010.

LI, M.A.; PETITT, S.J.; ECKERT, S.; NING, Z.; RICE, S.; CADINANOS, J.; YUSA, K.; CONTE, N.; BRADLEY, A. The piggyBac transposons displays local and distant reintegration preferences and can cause mutations at noncanonical integration sites. **Molecular and cellular biology**, v.33, n.7, p.1317-1330, 2013.

LIU, M.; CHOI, D. Y.; HUNTER, R. L.; PANDYA, J. D.; CASS, W. A.; SULLIVAN, P.G.; KIM, H. C.; GASH, D. M.; BING, G. Trichloroethylene induces dopaminergic neurodegeneration in Fisher 344 rats. **Journal of Neurochemistry**, v.112, n.3, p.773-783, 2010.

MARCHETTO M.C.; BELINSON H.; TIAN Y.; FREITAS B.C.; FU C.; VADODARIA K.; BELTRÃO-BRAGA P.C.B.; TRUJILLO C.A.; MENDES A.P.D.; PADMANABHAN K.; NUNEZ Y.; OU J.; GHOSH H.; WRIGHT R.; BRENNAND K.; PIERCE K.; EICHENFIELD L.; PRAMPARO T.; EYLER L.; BARNES C.C.; COURCHESNE E.; GESCHWIND D.H.; GAGE F.H.; WYNshaw-BORIS A.; MUOTRI A.R. Altered proliferation and networks in neural cells derived from idiopathic autistic Individuals. **Molecular Psychiatry**, v. 22, n. 6, p. 820-835, 2017.

MARCHETTO, M. C.; MOUTRI, A. R.; SMITH, A. M.; CEZER, G. G.; GAGE, F. H. Non-cell-autonomous effect of human SOD1 G37R astrocytes on motor neurons derived from human embryonic stem cells. **Cell Stem Cell**, v.3, n.6, p.649-57, 2008.

MARCHETTO, M. C.; CARROMEU, C.; ACAB, A.; YU, D.; YEO, G. W.; MU, Y.; CHEN, G.; GAGE, F. H.; MUOTRI, A. R. A Model for Neural Development and Treatment of Rett Syndrome Using Human Induced Pluripotent Stem Cells. **Cell**, v.143, n.4, p.527-39, 2010.

MEFFORD, H.C.; BATSHAW, M.L.; HOFFMAN, E.P. Genomics, intellectual disability, and autism. **The New England Journal of Medicine**, v. 366, n. 8, p. 733-743, 2012.

MEHLER, M.F. Brain dystrophin, neurogenetics and mental retardation. **Brain Research Reviews**, v.5, p.277-307, 2000.

MODABBERNIA, A.; VELTHORST, E.; REICHENBERG, A. Environmental risk factors for autism: an evidence-based review of systematic reviews and meta-analyses. **Molecular Autism**, v. 8, p.13, 2017.

MOORE, S.J.; TURNPENNY, P.; QUINN, A.; GLOVER, S.; LLOYD, D.J.; DEAN, J.C. A clinical study of 57 children with fetal anticonvulsant syndromes. **Journal of Medical Genetics**, v.37, n.7, p.489-97, 2000.

PAGNAMENTA, A.T.; HOLT, R.; YUSUF, M.; PINTO, D.; WING, K.; BETANCUR, C.; SCHERER, S.W.; VOLPI, E.V.; MONACO, A.P. A family with autism and rare copy number variants disrupting the Duchenne/Becker muscular dystrophy gene DMD and TRPM3. **Journal of Neurodevelopmental Disorders**, v. 3, n. 2, p. 124-131, 2011.

PALMER, R. F.; BLANCHARD, S.; WOOD, R. Proximity to point sources of environmental mercury release as a predictor of autism prevalence. **Health Place**, v.15, n.1, p.18-24, 2009.

PASÇA, S. P.; PORTMANN, T.; VOINEAGU, I.; YAZAWA, M.; SHCHEGLOVITOV, A.; PASÇA, A. M.; CORD, B.; PALMER, T. D.; CHIKAHISA, S.; NISHINO, S.; BERNSTEIN, J. A.; HALLMAYER, J.; GESCHWIND, D. H.; DOLMETSCH, R. E. Using iPSC-derived neurons to uncover cellular phenotypes associated with Timothy syndrome. **Nature Medicine**, v.17, n.12, p.1657-1662, 2011.

PHILLIPS, M.; POZZO-MILLER, L. Dendritic spine dysgenesis in autism related disorders. **Neuroscience Letters**, 2015.

PILGRAM, G.S.; POTIKANOND, S.; BAINES, R.A.; FRADKIN, L.G.; NOORDERMEER, J.N. The roles of the dystrophin-associated glycoprotein complex at the synapse. **Molecular Neurobiology**, v.41, n.1, p.1-21, 2010.

QUAAK I.; BROUNS M.R.; VAN DE BOR M. The dynamics of autism spectrum disorders: how neurotoxic compounds and neurotransmitters interact. **International Journal Environ Research. Public Health**, v. 10, n. 8, p. 3384-3408, 2013.

RIZK, A; RABIE, B.M. Electroporation for transfection and differentiation of dental pulp stem cells. **Bio Research**, v.2, n.2, p.155-162, 2013.

ROBERTS, R.G. Dystrophins and dystrobrevins. **Genome Biology**, v. 2, p. 3006.1-3006.7, 2002.

ROSMAN, N.P.; KAKULAS, B.A. Mental deficiency associated with muscular dystrophy. A neuropathological study. **Brain**, v.89, n.4, p.769-788, 1966.

ROSS, P.J.; ELLIS, J. Modeling complex neuropsychiatric disease with induced pluripotent stem cells. **F1000 biology reports**, v.2, p.84, 2010.

RUSO F.B.; FREITAS B.C.; PIGNATARI G.C.; FERNANDES I.R.; SEBAT J.; MUOTRI A.R.; BELTRÃO-BRAGA P.C.B. Modeling the interplay between neurons and astrocytes in autism using human induced pluripotent stem cells. **Biological Psychiatry**, v. 83, n. 7, p. 569-578, 2018.

SANDIN, S.; LICHTENSTEIN, P.; KUJA-HALKOLA, R.; LARSSON, H.; HULTMAN, C.M.; REICHENBERG, A. The familial risk of autism. **JAMA**. v. 311, n. 17, p.1770-1777, 2014.

SEALEY, L.A.; HUGHES, B.W.; SRISKANDA, A.N.; GUEST, J.R.; GIBSON, A.D.; JOHNSON-WILLIAMS, L.; PACE, D.G.; BAGASRA, O.. Environmental factors in the development of autism spectrum disorders. **Environment International**, v. 88, p.288-298, 2016.

SFARI GENE. Disponível em <gene-archive.sfari.org>. Acesso em: 18 mar. 2020.

SATE M.W.; LEVITT P. The conundrums of understanding genetic risks for autism spectrum disorders. *Nature Neuroscience*, v. 14, n. 12, p. 1499-1506, 2011.

SAJDEL-SULKOWSKA, E. M.; XU, M.; MCGINNIS, W.; KOIBUCHI, N. Brain region specific changes in oxidative stress and neurotrophin levels in autism spectrum disorders (ASD). **Cerebellum**, v.10, n.1, p.43–48, 2011.

SHCHEGLOVITOV, A.; SHCHEGLOVITOVA, O.; YAZAWA, M.; PORTMANN, T.; SHU, R.; SEBASTIANO, V.; KRAWISZ, A.; FROEHLICH, W.; BERNSTEIN, J. A.; HALLMAYER, J. F.; DOLMETSCH, R. E. SHANK3 and IGF1 restore synaptic deficits in neurons from 22q13 deletion syndrome patients. **Nature**, v.503, n.7475, p.267-271, 2013.

SCHMIDT, M. M.; ROHWEDDER, A.; DRINGEN, R. Effects of chlorinated acetates on the glutathione metabolism and on glycolysis of cultured astrocytes. **Neurotoxicity Research**, v.19, n.4, p.628-637, 2011.

TAKAHASHI, K.; YAMANAKA, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. **Cell**, v.126, n.4, p.663-676, 2006.

TAKAHASHI, K.; TANABE, K.; OHNUKI, M.; NARITA, M.; ICHISAKA, T.; TOMODA, K.; YAMANAKA, S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. **Cell**, v.131, n.5, p.861-872, 2007.

THOMSON, J.A.; ITSKOVITZ-ELDOR, J.; SHAPIRO, S.S.; WAKNITZ, M.A.; SWIERGIEL, J.J.; MARSHALL, V.S.; JONES, J.M. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. **Science**, v.282, n.5391, p.1145-1147, 1998.

UCHINO, M.; TERAMOTO, H.; NAOE, H.; YOSHIOKA, K.; MIIKE, T.; ANDO, M. Localization and characterisation of dystrophin in the central nervous system of controls and patients with Duchenne muscular dystrophy. **Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry**, v.57, n.4, p.426-429, 1994.

URBACH, A.; BAR-NUR, O.; DALEY, G. Q.; BENVENISTY, N. Differential modeling of fragile X syndrome by human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. **Cell Stem Cell**, v.6, n.5, p.407-11, 2010.

VERHAERT, D.; RICHARDS, K.; RAFAEL-FORTNEY, J. A.; RAMAN, S. V. Cardiac involvement in patients with muscular dystrophies: magnetic resonance imaging phenotype and genotypic considerations. **Circulation Cardiovascular Imaging**, v. 4, n. 1, p. 67-76, 2011.

VOINEAGU, I.; WANG, X.; JOHNSTON, P.; LOWE, J.K.; TIAN, Y.; HORVATH, S.; MILL, J.; CANTOR, R.M.; BLENCOWE, B.J.; GESCHWIND, D.H. Transcriptomic analysis of autistic brain reveals convergent molecular pathology. **Nature**, v.474, n.7351, p.380-384, 2011.

WALDMAN, M.; NICHOLSON, S.; ADILOV, N.; WILLIAMS, J. Autism prevalence and precipitation rates in California, Oregon, and Washington

counties. **Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine**, v.162, n.11, p.1026-1034, 2008.

WANG, C., LUAN, Z., YANG, Y., WANG, Z., CUI, Y., GU, G. Valproic acid induces apoptosis in differentiating hippocampal neurons by the release of tumor necrosis factor- from activated astrocytes. **Neuroscience Letters**, v.497, n.2, p.122-127, 2011.

WEE, C.Y.; WANG, L.; SHI, F.; YAP, P.T.; SHEN, D. Diagnosis of autism spectrum disorders using regional and interregional morphological features. **Human Brain Mapping**, v.35, n.7, p.3414-3430, 2014.

WINGEIER, K.; GIGER, E.; STROZZI, S.; KREIS, R.; JOUNCOURT, F.; CONRAD, B.; GALLATI, S.; STEINLIN, M. Neuropsychological impairments and the impact of dystrophin mutations on general cognitive functioning of patients with Duchenne muscular dystrophy. **Journal of Clinical Neuroscience**, v.18, n.1, p.90-95, 2011.

WU, J.Y.; KUBAN, K.C.; ALLRED, E.; SHAPIRO, F.; DARRAS, B.T. Association of Duchenne muscular dystrophy with autismo spectrum disorder. **Journal of Child Neurology**, v. 20, n. 10, p. 790-795, 2005.

YAMANAKA, S. Induced pluripotent stem cells: past, present, and future. **Cell Stem Cell**, v.10, n.6, p.678-684, 2014.

ZEIDÁN-CHULIÁ F.; GURSOY U.K.; KÖNÖNEN E.; GOTTFRIED C.A dental look at the autistic patient through orofacial pain. **Acta Odontologica Scandinava**, v. 69, n. 4, p. 193-200, 2011.

ZEIDÁN-CHULIÁ F.; RYBARCZYK-FILHO J.L.; SALMINA A.B.; DE OLIVEIRA B.H.; NODA M.; MOREIRA J.C. Exploring the multifactorial nature of autismo through computational systems biology: calcium and the Rho GTPase RAC1 under the spotlight. **Neuromolecular medicine**, v. 15, n. 2, p. 364-383, 2013.

ZEIDÁN-CHULIÁ, F.; SALMINA, A. B.; MALINOVSKAYA, N. A.; NODA, M.; VERKHRATSKY, A.; MOREIRA, J. C. The glial perspective of autism spectrum disorders. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v.38, p.160-72, 2014.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Avaliações médica, psiquiátrica e psicológica dos trigêmeos.

Paciente	Avaliação médica	Avaliação psiquiátrica / psicológicas
PDA 382		Ausência de autonomia para atividades de vida diária; ausência de intenção ou iniciativa para comunicação verbal, e comunicação não-verbal prejudicada; comportamentos estereotipados; comprometimento em sociabilidade; déficit de atenção; atraso no desenvolvimento neuropsíquico, com nível funcional abaixo do esperado para a idade; ótimo contato visual
PDD 11	hipotonia e atrofia muscular global, frouxidão ligamentar de membros superiores, aumento bilateral das panturrilhas; base alargada, hiperlordose lombar	Ausência de autonomia para atividades diárias; ausência de intenção comunicativa efetiva, comunicação através do choro e vocalizações; estereotipias verbais e motoras; sem interação social; grande deficit de atenção e no desenvolvimento neuro-psico-motor, nível de funcionalidade inferior ao esperado para a idade; contato visual pouco frequente e fugaz; imaturidade e atraso no desenvolvimento intelectual
PDD 12	hipotonia e atrofia muscular global, frouxidão ligamentar global, aumento bilateral das panturrilhas; base alargada, hiperlordose lombar; levanta do chão c/ sinal de Gowers típico	ausência de autonomia para atividades da vida diária; transtorno da linguagem; comportamentos estereotipados; déficit na interação social, de atenção, e no desenvolvimento neuro-psico-motor; contato visual pouco frequente e fugaz, porém de fácil vínculo e afetivo;

Fonte: Guimarães, K.O.P. (2020)

APÊNDICE B – Nível de CK dos pacientes distróficos.

Paciente	CK
PDD 11	7585 U/L
PDD 12	4047 U/L

Fonte: Guimarães, K.O.P. (2020)

Legenda: CK=creatinoquinase total; valores de referência para CK: 30-150 U/L.

ANEXOS

Anexo A – Cugola, F.R.; Fernandes, I.R.; Russo, F.B.; Freitas, B.C.; Dias, J.L.M.; Guimarães, K.O.P.; Benazzato, C.; Almeida, N.; Pignatari, G.C.; Romero, S.; Polonio, C.M.; Cunha, I.; Freitas, C.L.; Brandão, W.N.; Rossato, C.; Andrade, D.G.; Faria, D.P.; Garcez, A.T.; Buchpiget, C.A.; Braconi, C.T.; Mendes, E.; Sall, A.A.; Zanotto, P.M.A.; Peron, J.P.S.; Muotri, A.R.; Beltrão-Braga, P.C.B. The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. *Nature*, v. 534, n. 7606, p. 267-271, 2016.

LETTER

doi:10.1038/nature18296

The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models

Fernanda R. Cugola^{1*}, Isabella R. Fernandes^{1,2*}, Fabiele B. Russo^{1,3*}, Beatriz C. Freitas², João L. M. Dias¹, Katia P. Guimarães¹, Cecília Benazzato¹, Nathalia Almeida¹, Graciela C. Pignatari^{1,3}, Sarah Romero², Carolina M. Polonio⁴, Isabela Cunha⁴, Carla L. Freitas⁴, Wesley N. Brandão⁴, Cristiano Rossato⁴, David G. Andrade⁴, Daniele de P. Faria⁵, Alexandre T. Garcez⁵, Carlos A. Buchpiguel⁵, Carla T. Braconi⁶, Erica Mendes⁶, Amadou A. Sall⁷, Paolo M. de A. Zanotto⁸, Jean Pierre S. Peron⁴, Alysson R. Muotri² & Patricia C. B. Beltrão-Braga^{1,8}

Zika virus (ZIKV) is an arbovirus belonging to the genus *Flavivirus* (family *Flaviviridae*) and was first described in 1947 in Uganda following blood analyses of sentinel rhesus monkeys¹. Until the twentieth century, the African and Asian lineages of the virus did not cause meaningful infections in humans. However, in 2007, vectored by *Aedes aegypti* mosquitoes, ZIKV caused the first noteworthy epidemic on Yap Island in Micronesia². Patients experienced fever, skin rash, arthralgia and conjunctivitis². From 2013 to 2015, the Asian lineage of the virus caused further massive outbreaks in New Caledonia and French Polynesia. In 2013, ZIKV reached Brazil, later spreading to other countries in South and Central America³. In Brazil, the virus has been linked to congenital malformations, including microcephaly and other severe neurological diseases, such as Guillain-Barré syndrome^{4,5}. Despite clinical evidence, direct experimental evidence showing that the Brazilian ZIKV (ZIKV^{BR}) strain causes birth defects remains absent⁶. Here we demonstrate that ZIKV^{BR} infects fetuses, causing intrauterine growth restriction, including signs of microcephaly, in mice. Moreover, the virus infects human cortical progenitor cells *in vitro*, leading to an increase in cell death. We also report that the infection of human brain organoids results in a reduction of proliferative zones and disrupted cortical layers. These results indicate that ZIKV^{BR} crosses the placenta and causes microcephaly by targeting cortical progenitor cells, inducing cell death by apoptosis and autophagy, and impairing neurodevelopment. Our data reinforce the growing body of evidence linking the ZIKV^{BR} outbreak to the alarming number of cases of congenital brain malformations. Our model can be used to determine the efficiency of therapeutic approaches to counteracting the harmful impact of ZIKV^{BR} in human neurodevelopment.

The recent increase in microcephaly cases in Brazil has been associated with the outbreak of Zika virus (ZIKV)⁷, originating from an Asian-lineage strain that can be spread by *Ae. aegypti* mosquitoes⁸. The Brazilian ZIKV (ZIKV^{BR}) has been detected in the placenta and amniotic fluid of two women with microcephalic fetuses^{9–11} and in the blood of microcephalic newborns^{10,12}, suggesting that the virus can cross the placental membrane. The virus has also been identified in the brains and retinas of microcephalic fetuses^{11–13}. However, there is no direct evidence of the mechanism by which ZIKV^{BR} might cause brain malformations. A previous study revealed that the African ZIKV (ZIKV^{AF}, strain MR-766) has the ability to infect human skin cells¹⁴. Neurons and astrocytes in the mouse brain could also be infected, inducing hippocampal degeneration and necrosis of pyriform cells

7 days post-infection¹⁵. More recently, ZIKV^{AF} was also shown to infect human pluripotent stem cell (hPSC)-derived neural progenitor cells (NPCs) *in vitro*, which induced apoptotic cell death¹⁶. These studies were performed using the MR-766 ZIKV^{AF} strain isolated in Uganda in 1947, which shares 87–90% sequence similarity with the Polynesian and Brazilian isolates^{3,17}. Nevertheless, because severe congenital malformations were not reported for African isolates, there is a need to study the association of ZIKV with microcephaly and birth defects with isolates from affected localities, such as the ZIKV^{BR} strain. Therefore, there is an urgent need to develop model systems to determine the relationship between infection with the ZIKV^{BR} strain and birth defects.

We used ZIKV^{BR} isolated from a febrile case in the state of Paraíba, in the northeast of Brazil in 2015 (see Methods). To evaluate the causal relationship between ZIKV^{BR} and birth defects, including brain malformation during development, we first used a murine experimental model in which SJL and C57BL/6 pregnant mice were infected with ZIKV^{BR}, evaluating newborns immediately after birth (Extended Data Fig. 1a). Notably, similar to ZIKV^{BR}-infected human newborns^{18,19}, pups born from the SJL ZIKV^{BR}-infected pregnant females displayed clear evidence of whole-body growth delay or intrauterine growth restriction (IUGR)²⁰ compared to pups born from the mock-infected controls (Fig. 1a, b). Using a qPCR assay, we confirmed the presence of ZIKV^{BR} genomic RNA in several tissues of newborn animals, observing significantly more viral RNA in the brain, confirming the neurotropic nature of the virus (Fig. 1c).

Microcephaly is perhaps the most striking of the birth defects reported in ZIKV^{BR}-infected newborns^{4,18,19}. Mouse models often fail to reproduce the severely reduced brain size and pathological alterations found in human patients^{21,22}, probably owing to differences in gestation time and brain development between the two species. Nevertheless, upon close inspection of the ZIKV^{BR}-infected mouse brains, we noticed cortical malformations in the surviving animals, with reduced cell number and cortical layer thickness, signs associated with microcephaly in humans (Fig. 1d–f). At a cellular level, the neurons in the cortex, thalamus and hypothalamus displayed a ‘vacuolar nuclei’ appearance. This morphology was characterized by central emptiness and marginalized chromatin pattern with nuclear debris, suggesting ongoing cellular death (Fig. 1d and Extended Data Fig. 2). In addition, we also noticed apparent ocular abnormalities, reminiscent of that observed in human patients²³ (Fig. 1g). Thus, SJL infected pups presented congenital malformations with similarities to those in ZIKV^{BR}-infected human newborns. While the impact of ZIKV^{BR}

¹University of São Paulo, Department of Surgery, Stem Cell Laboratory, São Paulo, São Paulo 05508-270, Brazil. ²University of California San Diego, School of Medicine, Department of Pediatrics/Rady Children’s Hospital San Diego, Department of Cellular & Molecular Medicine, Stem Cell Program, La Jolla, California 92037-0695, USA. ³Tismoo, The Biotech Company, São Paulo, São Paulo 01401-000, Brazil. ⁴University of São Paulo, Department of Immunology, Neuroimmune Interactions Laboratory, São Paulo, São Paulo 05508-000, Brazil. ⁵University of São Paulo, Department of Radiology and Oncology, USP School of Medicine, São Paulo, São Paulo 05403-010, Brazil. ⁶University of São Paulo, Department of Microbiology, Institute of Microbiology Sciences, Laboratory of Molecular Evolution and Bioinformatics, São Paulo, São Paulo 05508-000, Brazil. ⁷Institute Pasteur in Dakar, Dakar 220, Sénégal. ⁸University of São Paulo, School of Arts, Sciences and Humanities, Department of Obstetrics, São Paulo, São Paulo 03828-000, Brazil.

*These authors contributed equally to this work.

RESEARCH LETTER

Figure 1 | ZIKV^{BR} infection in SJL mice. **a**, SJL pups born with IUGR. Scale bar, 1 cm. **b**, Total body weight, crown-rump and skull measurements in pups born from infected animals ($n = 6$ pups, comprising 3 mice from 2 separate litters; error bars, s.e.m.; t -test, $^{**}P < 0.01$). **c**, ZIKV^{BR} RNA detected in SJL pup tissues ($n = 6$ pups, comprising 3 mice from 2 separate litters; error bars, s.e.m.; t -test). **d**, Histopathological aspect of the cortical organization (brackets) in infected brains, including intranuclear vacuoles, and 'empty' nuclei aspect with chromatin margination in neurons (arrowheads). Scale bar, 100 µm (left panels), 50 µm (middle panels) and 10 µm (right panels). **e**, ZIKV^{BR}-infected brains

displayed a reduced cortical layer thickness ($n = 6$ pups, comprising 3 mice from 2 separate litters; error bars, s.e.m.; t -test, $^{***}P < 0.001$). Infected brains have fewer cells per layer ($n = 6$ pups, comprising 3 mice from 2 separate litters; error bars, s.e.m.; t -test, $^{**}P < 0.1$). **f**, ZIKV^{BR}-infected cortical neurons have pronounced nuclei (diameter) (cortical, $n = 31$; deep cortical, $n = 21$ and medulla, $n = 41$ nuclei; error bars, s.e.m.; two-way ANOVA, $^{****}P < 0.001$). **g**, Ocular malformations (arrow) in the ZIKV^{BR}-infected pups. **h**, Cell death gene expression signature in the brains of ZIKV^{BR}-infected pups ($n = 2$ mice per group; threshold = twofold).

infection in the SJL mice was notable, no major body alterations were detected in pups from the infected C57BL/6 animals (Extended Data Fig. 1a–c). To exclude potential minor alterations in the C57BL/6 mice, computed tomography (CT) scans were performed to quantify the skull/body volumes. No significant changes in the pups born from the ZIKV^{BR}-infected C57BL/6 mothers were observed compared to the controls (Extended Data Fig. 1d, e). A diagnostic qPCR assay of the pups from the ZIKV^{BR}-infected animals was negative, suggesting that the virus did not cross the placenta in the C57BL/6 mouse strain (Extended Data Fig. 1f). To elucidate the type of cell death induced by ZIKV^{BR} in the brains of SJL pups, we used a qPCR array to distinguish different molecular pathways involved. Our data indicate that ZIKV^{BR} infection influences the regulation of genes intimately linked to autophagy and apoptosis, such as upregulation of *Bmf*, *Irgm1*, *Bcl2*, *Htt*, *Casp6* and *Abl1*. Conversely, *Gadd45a*, *Tnfrsf11b*, *Fasl*, *Atg12*, *Bcl2l11* and *Dffa* were highly suppressed (Fig. 1h and Extended Data Fig. 1g, h).

Next, we evaluated the impact of ZIKV^{BR} infection in human neural cells derived from hPSCs to establish a correlation between ZIKV and impairment of neurogenesis (Extended Data Fig. 3a). We generated human cortical NPCs and neurons from healthy donor hPSCs. First, we determined the expression levels of the TYRO3, AXL and MERTK (TAM) receptors tyrosine kinases in NPCs and neurons. This is an

important family of receptors used for cell invasion by the Dengue virus and ZIKV, and AXL has been recently proposed as a candidate receptor for ZIKV infection during neurogenesis^{14,24}. Mock-infected NPCs expressed higher levels of AXL when compared to mock-infected neurons (Fig. 2a). However, no significant changes in expression levels were observed upon ZIKV infection in NPCs (Fig. 2b). We then investigated the impact of ZIKV^{BR} and ZIKV^{AF} infection in NPCs and neurons. After infection using a viral multiplicity of infection (MOI) of 10, ZIKV^{BR} particles were detected inside the NPCs and neurons at several stages of viral assembly using transmission electron microscopy (Fig. 2c). Immunostaining performed on NPCs and neurons at both an MOI of 10 and an MOI of 1 revealed production of viral protein aggregates (Fig. 2d and Extended Data Fig. 3b, c). With an MOI of 10, the amount of ZIKV^{BR} particles in the NPC and neuron culture supernatant increased over time, suggesting the efficient production of infectious viral particles (Fig. 2e, f). With an MOI of 1, NPCs, but not neurons, continued to produce ZIKV^{BR} RNA in the culture supernatant (Extended Data Fig. 3d, e). After 96 h post-infection, we observed significant cell death in NPC cultures using fluorescence-activated cell (FAC) analyses. We quantified cell death over time in NPC cultures and detected an increase in the number of apoptotic/necrotic cells both in the ZIKV^{BR}- and ZIKV^{AF}-treated cultures compared to the

Figure 2 | ZIKV infection *in vitro*. **a**, Relative expression of TAM receptors ($n = 2$ technical replicates from two pooled different donors; error bars, s.e.m.; t -test; $***P < 0.01$). **b**, Expression of TAM receptors in NPCs after ZIKV^{BR} infection (MOI = 10) at 48 h post-infection ($n = 2$ technical replicates from two pooled different donors; error bars, s.e.m.; one-way ANOVA, $P > 0.05$). **c**, TEM detection of ZIKV^{BR} viral particles 24 h post-infection at MOI = 10 (red arrowheads) inside NPCs (top panels) and neurons (bottom panels). Yellow arrowheads, viral factories; white arrowheads, immature viral particles. Scale bars, 0.5 μ m (top left); 200 nm (top right); 0.2 μ m (bottom left); 50 nm (bottom right). **d**, Immunofluorescence revealed susceptibility to infection in NPC and neurons with the ZIKV^{BR} (MOI = 10) at 24 h post-infection. Scale bar, 25 μ m. **e**, ZIKV^{BR} replication dynamics in NPCs (MOI = 10;

$n = 2$ technical replicates from RNA of two different donors). **f**, ZIKV^{BR} replication dynamics in neurons (MOI = 10; $n = 2$ technical replicates from RNA of two different donors). **g**, NPC death measured by FACS with two different cell gating sizes (P1 and P2). Apoptosis (left panel), necrosis (middle panel) and late apoptosis (right panel) (MOI = 10; 48 h post-infection; $n = 2$ technical replicates from two different donors; error bars, s.e.m.; two-way ANOVA, $*P < 0.05$). PI, propidium iodide. **h**, Representative images of human neurospheres infected with ZIKV^{BR} (MOI = 10; 96 h post-infection). Scale bar, 200 μ m. **i**, Alterations in neurosphere diameter over time (MOI = 10; $n = 25$ neurospheres from two different donors for each time point; error bars, s.e.m.; ANOVA, $****P < 0.0001$). **j**, ZIKV replication dynamics in neurospheres (MOI = 10; $n = 2$ technical replicates from two different donors).

mock-infected cultures at an MOI of 10 (Fig. 2g), but not at an MOI of 1 during the same time frame (Extended Data Fig. 3f). No difference in neuronal cell death was observed between the two ZIKV strains at an MOI of 10 and an MOI of 1 (Extended Data Fig. 3g, h).

Next, we challenged two three-dimensional neural cell culture systems, neurospheres and cerebral organoids, with ZIKV^{BR} and ZIKV^{AF}. We generated neurospheres by growing human NPCs in suspension. While the mock-infected control neurospheres continued to grow over time, the ZIKV^{BR}-infected neurospheres (MOI of 10) displayed evident morphological abnormalities with signs of cell death (Fig. 2h). The sizes of the neurospheres infected with ZIKV^{BR} were significantly smaller than the mock-control and ZIKV^{AF}-infected at 96 h post-infection (Fig. 2i). A less dramatic effect is observed at an MOI of 1, where both ZIKV^{BR} and ZIKV^{AF} infection reduced the size of the neurospheres compared to mock-infected controls (Extended Data Fig. 4a, b). These observations were paired with increased ZIKV^{BR} replication in these cultures at both MOIs of 10 and 1 (Fig. 2j and Extended Data Fig. 4c). These results suggest that ZIKV^{BR} induces cell death in human NPCs,

impairing the growth and morphogenesis of healthy neurospheres (Extended Data Fig. 4d–f).

The majority of the described cases of ZIKV^{BR}-infected newborns (95%) had malformations of cortical development⁴. Thus, we also used brain organoids generated from hPSCs and human embryonic stem cells, to evaluate the impact of ZIKV^{BR} on human cortical development. In the following experiments, alongside the ZIKV^{AF} and mock infection, we added the Yellow Fever virus (YFV), a slow replicating attenuated live-vaccine Flavivirus that has a low risk of causing neuropathy. Cerebral organoids are three-dimensional, self-organized, stem-cell-derived models that recapitulate the first trimester of human neurodevelopment, including the molecular and cellular architecture reminiscent of the fetal cortex²⁵. Organoids show some degree of lamination and resembled the human neocortex in terms of the spatial relationships of the progenitor populations, defined here as a proliferative ventricular zone, post-migratory neurons in cortical plate and a marginal zone (Fig. 3a–c). We infected organoids with ZIKV^{BR}, ZIKV^{AF} and YFV

Figure 3 | Cortical alterations in human brain organoids infected with ZIKV. **a**, Representative image of a human cerebral organoid showing the marginal zone (MZ), cortical plate (CP) and ventricular zone (VZ), delineated by dotted white lines. Scale bar, 200 μ m. **b**, Representative images of the CP stained for CTIP2, TBR1, MAP2 or TUJ1 (neurons). Scale bar, 50 μ m. **c**, Representative images of the proliferative regions in the VZ stained for Ki67, PAX6, and cleaved caspase-3 (CASP3). Scale bar, 50 μ m. **d**, Percentage of TBR1-positive cells in relation to mock-infected controls (dotted line) (MOI = 0.1; $n = 3$ replicates from three human cell lines; error bars, s.e.m.; ANOVA, $**P = 0.0025$). **e**, Percentage of CTIP2-positive cells (MOI = 0.1; $n = 3$ replicates from three human

cell lines; error bars, s.e.m.; ANOVA, $****P < 0.001$; $*P = 0.0430$). **f**, Percentage of PAX6-positive cells (MOI = 0.1; $n = 3$ replicates from three human cell lines; error bars, s.e.m.; ANOVA, $*P = 0.0212$ (ZIKV^{BR}) and $*P = 0.0221$ (ZIKV^{AF})). **g**, Percentage of Ki67-positive cells (MOI = 0.1; $n = 3$ replicates from three human cell lines; error bars, s.e.m.; ANOVA, $****P < 0.001$). **h**, Percentage of SOX2-positive cells (MOI = 0.1; $n = 3$ replicates from three human cell lines; error bars, s.e.m.; ANOVA, $***P = 0.0003$). **i**, Percentage of cleaved-caspase3-positive cells (CASP3) (MOI = 0.1; $n = 3$ replicates from three human cell lines; error bars, s.e.m.; ANOVA, $***P = 0.0002$).

using an MOI of 0.1 and compared to mock-infected organoids at 24 and 96 h post-infection. We quantified the percentage of different subtypes of cortical neurons, TBR1-positive or CTIP2-positive cells (deep-layer V/V1) in the cortical plate, finding a significant reduction in their number and respective cortical plate thickness in the ZIKV^{BR}-infected organoids compared to the others. A significant reduction in TBR1-positive cells was observed in the ZIKV^{BR}-infected organoids at 96 h post-infection, while CTIP2-positive cells were significantly reduced in both ZIKV^{BR}- and ZIKV^{AF}-infected organoids at the same time point (Fig. 3d, e and Extended Data Fig. 5a–f). Consistent with the reduced population of cortical neurons, we observed a significant decrease in PAX6-positive cells (dorsal forebrain progenitor cells) following ZIKV infection (Fig. 3f and Extended Data Fig. 5d). Dividing cells in the ventricular zone, detected by the population of Ki67- and SOX2-positive cells, were only significantly reduced in the ZIKV^{BR}-infected organoids (Fig. 3g, h and Extended Data Fig. 5d). As observed in our other *in vitro* models, the number of apoptotic cells (cleaved caspase 3- and TUNEL-positive cells) was increased in organoids infected with ZIKV^{BR}, possibly explaining the decrease in the NPC population (Fig. 3i and Extended Data Fig. 5g, h).

ZIKV^{AF} was derived from a zoonotic agent associated with primates in Africa, whereas ZIKV^{BR} is an isolate from a lineage adapted to human-to-human transmission for the past 70 years. As an entry point to establishing the potential mechanistic adaptive differences

between ZIKV^{BR} and ZIKV^{AF} towards human cells, we also generated brain organoids from non-human primate (chimpanzee) pluripotent stem cells. We infected these chimpanzee's cerebral organoids (MOI of 0.1) and measured the impact on cortical neurons at 24 and 96 h post-infection. ZIKV^{BR} failed to reduce the percentage of either TBR1- or CTIP2-positive cells in non-human primates (Extended Data Fig. 5i, j). Consistently, the kinetics of infection were different between the two ZIKV isolates. While ZIKV^{BR} did not replicate in the chimpanzee organoids, ZIKV^{AF} seemed well adapted to these cells (Extended Data Fig. 5k).

To evaluate the causal relationship between ZIKV congenital infection and birth defects, we used a murine experimental model, in which pregnant SJL and C57BL/6 mice were infected with ZIKV^{BR}. Notably, the SJL strain was susceptible to viral infection of fetal tissues, causing severe IUGR that resembled the affected Brazilian newborns, including signs of microcephaly, such as cortical malformations⁴. We also showed that ZIKV^{BR} induced apoptosis and autophagy in the mouse neural tissue. This is in accordance with the literature, as it has been previously demonstrated that ZIKV induces and localizes in autophagic phagosomes¹⁴. To our knowledge, this is the first report showing a gene expression profile that correlates to cell death in the brains of microcephalic newborn ZIKV^{BR}-infected mice, corroborating a causal relationship. It is unclear why the virus could not cross the placenta of C57BL/6 mice, but this result may be due to the robust anti-viral

immune response of this mouse strain, which secretes significant levels of type I/II interferon, known to confer resistance to ZIKV^{14,26}. These data suggest that genetic differences could explain in part why some ZIKV-infected pregnant women give birth to newborns without detectable congenital brain malformations²⁷. Nonetheless, our murine model is a valuable tool for future pre-clinical studies, such as vaccine development. The presence of major cortical histological abnormalities in the pups with IUGR prompted us to use an hPSC model to study the impact of ZIKV on neurodevelopment. ZIKV infects cells at different stages of brain maturation leading to alterations in the cortical layer organization. While this manuscript was under review, two other papers revealed the impact of previously established ZIKV strains on human organoids, confirming our observations with ZIKV^{BR} (refs 28, 29). Finally, our data using a non-human primate organoids suggested that the ZIKV^{BR} might have experienced adaptive changes in human cells. It has been demonstrated that the Asian lineage of ZIKV is undergoing codon usage adaptation towards biases observed in highly expressed human genes³⁰. Our findings support the hypothesis that microcephaly is a distinctive feature of recent ZIKV Asian-lineage virus, which originated in the Pacific and is now spreading in South and Central America.

Online Content Methods, along with any additional Extended Data display items and Source Data, are available in the online version of the paper; references unique to these sections appear only in the online paper.

Received 19 March; accepted 4 May 2016.

Published online 11 May 2016.

- Dick, G. W., Kitchen, S. F. & Haddow, A. J. Zika virus. I. Isolations and serological specificity. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **46**, 509–520 (1952).
- Lancioti, R. S. et al. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerg. Infect. Dis.* **14**, 1232–1239 (2008).
- Faria, N. R. et al. Zika virus in the Americas: early epidemiological and genetic findings. *Science* **352**, 345–349 (2016).
- de Fatima Vasco Aragao, M. et al. Clinical features and neuroimaging (CT and MRI) findings in presumed Zika virus related congenital infection and microcephaly: retrospective case series study. *Br. Med. J.* **353**, i1901 (2016).
- Cao-Lormeau, V. M. et al. Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. *Lancet* **387**, 1531–1539 (2016).
- Rasmussen, S. A., Jamieson, D. J., Honein, M. A. & Petersen, L. R. Zika virus and birth defects - reviewing the evidence for causality. *N. Engl. J. Med.* **374**, 1981–1987 (2016).
- Campos, G. S., Bandeira, A. C. & Sardi, S. I. Zika virus outbreak, Bahia, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* **21**, 1885–1886 (2015).
- Hayes, E. B. Zika virus outside Africa. *Emerg. Infect. Dis.* **15**, 1347–1350 (2009).
- Sarno, M. et al. Zika Virus infection and stillbirths: a case of hydrops fetalis, hydranencephaly and fetal demise. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **10**, e0004517 (2016).
- Calvet, G. et al. Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. *Lancet Infect. Dis.* [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)00095-5](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(16)00095-5) (2016).
- Martines, R. B. et al. Notes from the field: evidence of Zika virus infection in brain and placental tissues from two congenitally infected newborns and two fetal losses - Brazil, 2015. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **65**, 159–160 (2016).
- Malakar, J. et al. Zika virus associated with microcephaly. *N. Engl. J. Med.* **374**, 951–958 (2016).
- Ventura, C. V., Maia, M., Bravo-Filho, V., Góis, A. L. & Belfort, R., Jr. Zika virus in Brazil and macular atrophy in a child with microcephaly. *Lancet* **387**, 228 (2016).
- Hamel, R. et al. Biology of Zika virus infection in human skin cells. *J. Virol.* **89**, 8880–8896 (2015).
- Bell, T. M., Field, E. J. & Narang, H. K. Zika virus infection of the central nervous system of mice. *Arch. Gesamte Virusforsch.* **35**, 183–193 (1971).
- Tang, H. et al. Zika virus infects human cortical neural progenitors and attenuates their growth. *Cell Stem Cell* **18**, 587–590 (2016).
- Faye, O. et al. Molecular evolution of Zika virus during its emergence in the 20(th) century. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **8**, e2636 (2014).
- Brasil, P. et al. Zika virus outbreak in Rio de Janeiro, Brazil: clinical characterization, epidemiological and virological aspects. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **10**, e0004636 (2016).
- Brasil, P. et al. Zika virus infection in pregnant women in Rio de Janeiro - preliminary report. *N. Engl. J. Med.* <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1602412> (2016).
- Jang, E. A., Longo, L. D. & Goyal, R. Antenatal maternal hypoxia: criterion for fetal growth restriction in rodents. *Front. Physiol.* **6**, 176 (2015).
- Lizarraga, S. B. et al. Cdk5rap2 regulates centrosome function and chromosome segregation in neuronal progenitors. *Development* **137**, 1907–1917 (2010).
- Pulvers, J. N. et al. Mutations in mouse *Aspm* (abnormal spindle-like microcephaly associated) cause not only microcephaly but also major defects in the germline. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **107**, 16595–16600 (2010).
- de Paula Freitas, B. et al. Ocular findings in infants with microcephaly associated with presumed Zika virus congenital infection in Salvador, Brazil. *JAMA Ophthalmol.* **134**, 529–535 (2016).
- Nowakowski, T. J. et al. Expression analysis highlights AXL as a candidate Zika virus entry receptor in neural stem cells. *Cell Stem Cell* **18**, 591–596 (2016).
- Lancaster, M. A. et al. Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature* **501**, 373–379 (2013).
- Rossi, S. L. et al. Characterization of a novel murine model to study Zika virus. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* <http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.16-0111> (2016).
- Cauchemez, S. et al. Association between Zika virus and microcephaly in French Polynesia, 2013–15: a retrospective study. *Lancet* **387**, 2125–2132 (2016).
- Garcez, P. P. et al. Zika virus impairs growth in human neurospheres and brain organoids. *Science* **352**, 816–818 (2016).
- Qian, X. et al. Brain-region-specific organoids using mini-bioreactors for modeling ZIKV exposure. *Cell* **165**, 1–17 (2016).
- Freire, C. C. d. M. et al. Spread of the pandemic Zika virus lineage is associated with NS1 codon usage adaptation in humans. Preprint at <http://biorxiv.org/content/early/2015/11/25/032839> (2015).

Acknowledgements This work was supported by grants from the Zika Network FAPESP projects 2011/18703-2 and 2014/17766-9, the NGO 'The Tooth Fairy Project', the National Institutes of Health through the U19MH107367, R01MH094753 and an NARSAD Independent Investigator Grant to A.R.M. We would like to thank M. Gonçalves and M. A. Miglino for scientific discussions, G. Amarante-Mendes for the FITC-Annexin V reagent, M. Zatz for the SJL mice, E. Durigon and his group for the ZIKV^{BR} aliquots, P. Vasconcelos for providing a lyophilized ZIKV^{BR} seed, N. Olsen for reagent and equipment support, D. Candido for analysis support, F. Mastrantonio for drawings and R. E. Grassi for electron and confocal microscopy support.

Author Contributions F.R.G. derived the NPCs, neurons and neurospheres, performed the viral infections and cell analyses and analysed the data. I.R.F. performed the viral infections of cells, processed and analysed infected brain organoids, prepared manuscript figures and analysed the data. F.B.R. derived the NPCs, performed immunostainings and analyses, prepared manuscript figures and analysed the data. B.C.F. revised the manuscript and with S.R. generated the organoid cultures from iPSCs and assisted with the immunofluorescence staining and experimental design. J.L.M.D. performed macroscopic and microscopic staining and analyses of the mice. K.O.P.G. performed the TEM experiments, RNA extraction and quantification and histopathological analyses. C.B. and N.S. performed RNA extraction and quantification and prepared figures. G.C.P. performed cell cultures, analysed the data and revised the manuscript. C.M.P., I.C., C.L.F., W.N.B. and C.R. performed cell death qPCR assays and flow cytometry. D.G.A. performed flow cytometry staining protocols and analysed the data. C.M.P., I.C. and D.G.A. infected and observed the pregnant mice daily. C.M.P., C.L.F., I.C. and C.R. processed the mouse tissues for virus quantification and further analyses. D.P.F., A.T.G. and A.B. performed the CT scans and analysed and plotted the data. C.T.B. and E.A.M. performed virus amplification, titration and gene expression analysis. A.A.S. provided MR766 and YFV-17D isolates and serological reagents. P.M.A.Z. designed the experiments and revised the manuscript. J.P.S.P., A.R.M. and P.C.B.B.-B. designed the experiments, analysed the data and wrote the manuscript.

Author Information Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints. The authors declare no competing financial interests. Readers are welcome to comment on the online version of the paper. Correspondence and requests for materials should be addressed to P.C.B.B.-B. (patriciaacbbbraga@usp.br); A.R.M. (muotri@ucsd.edu) or J.P.S.P. (jeanpierre@usp.br).