ISABELLA RODRIGUES FERNANDES

**Modelagem neuronal de pacientes com distrofia muscular de
Duchenne utilizando células pluripotentes induzidas**

SÃO PAULO

2015

ISABELLA RODRIGUES FERNANDES

**Modelagem neuronal de pacientes com distrofia muscular de Duchenne
utilizando células pluripotentes induzidas**

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 em Doutor de Ciências

Departamento:

Cirurgia

Área de concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientadora:

Prof^a. Dr^a. Patrícia Cristina Baleeiro Beltrão Braga

Co-Orientador:

Prof. Dr. Luiz Fernando Zerbini

São Paulo

2015

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.3108
FMVZ

Fernandes, Isabella Rodrigues

Modelagem neuronal de pacientes com distrofia muscular de Duchenne utilizando
células pluripotentes induzidas / Isabella Rodrigues Fernandes. -- 2015.
100 f. :il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária
e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2015.

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

Orientador: Profa. Dra. Patrícia Cristina Baleeiro Beltrão Braga.
Co-orientador: Prof. Dr. Luiz Fernando Zerbini.

1. Distrofia muscular de Duchenne. 2. Distrofina. 3. Modelagem de doenças. 4.
SHED. 5. iPSC. 6. Reprogramação celular. 7. Neurônios. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Modelagem neuronal de pacientes com distrofia muscular de Duchenne utilizando células pluripotentes induzidas", protocolado sob o nº 3150/2013, utilizando 15 (quinze) camundongos, sob a responsabilidade do(a) Profa. Dra. Patrícia Cristina Baleeiro Beltrão Braga, foi aprovado em reunião de 16/10/2013 e está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

We certify that the Research "Neuronal modeling in Duchenne muscular dystrophy patients using induced pluripotent cells", protocol number 3150/2013, utilizing 15 (fifteen) mice, under the responsibility Profa. Dra. Patrícia Cristina Baleeiro Beltrão Braga, was approved in the meeting of day 16/10/2013 and agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee in the Use of Animals of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo.

São Paulo, 17 de outubro de 2013.

Alice Maria Melville Paiva Della Libera
Vice-Presidente no exercício

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fone: + 55 11 3091-7671/7676
Fax: +55 11 3032-2224
E-mail: ceuavet@usp.br
<http://www.fmvz.usp.br>

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone: (55) (011) 3091.7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

Decl. CEP SH.041 /13.

DECLARAÇÃO

Em adendo ao PARECER 1001/CEP, de 13 de junho de 2011, declaro que esta Comissão em reunião de 21.08.13 , aprovou a inclusão do Projeto "Modelagem neuronal de pacientes com distrofia muscular de Duchene utilizando células pluripotentes induzidas" da aluna ISABELLA RODRIGUES FERNANDES, no Projeto intitulado: "Reprogramação celular de polpa dentária humana para o estudo dos mecanismos biológicos envolvidos no autismo: projeto a fada do dente" uma vez que se trata de utilização do material coletado em estudo já aprovado em período anterior à Plataforma Brasil e sob responsabilidade da Profa. Dra. PATRÍCIA CRISTINA BALEEIRO BELTRÃO BRAGA.

São Paulo, 27 de agosto de 2013.

Prof. Dr. Paolo M.A. Zanotto
Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB /USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: FERNANDES, Isabella Rodrigues

Título: Modelagem neuronal de pacientes com distrofia muscular de Duchenne utilizando células pluripotentes induzidas

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 em Doutor de Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Dedico este trabalho aos meus pais, Graça e Odilon com muita gratidão e por me ajudarem todos estes anos.

Dedico este trabalho ao meu namorado, Fabricius Mastroantonio, que esteve sempre ao meu lado e me ajudou em todas as etapas da minha vida.

Dedico este trabalho à todos os pacientes DMD que são exemplos de vida!

Agradecimentos

À CAPES pela bolsa concedida durante o doutorado e também a bolsa de doutorado sanduíche (14594/2013).

À Patricia Braga, por ser mais uma vez a minha orientadora e sempre acreditar no meu potencial, mesmo eu não achando...Obrigada por tudo e por todos os ensinamentos, paciência e principalmente por sua determinação, pois acho que você não é somente uma orientadora, é a nossa mãe!

Ao Prof. Dr. Alysson Muotri, por ter aceitado o meu estágio em seu laboratório e acreditado em meu trabalho, principalmente pelo ensinamento científico passado a cada labmeeting.

À Graciela Pignatari, sem ela não teria aprendido muitas das coisas que sei hoje e a cada dia que passo sei que tenho muito que agradece-la....obrigada por tudo...

À Bia Freitas, sem você não teria aprendido tudo o que era preciso. Obrigada por me receber de braços abertos em SD e especialmente pela paciência e tempo que você teve durante 7 meses.....

Ao meu co-orientador Luiz Fernando Zerbini, que mesmo estando longe, acreditou neste trabalho.

À Dra. Ana Lúcia Langer por ajudar com os contatos dos pacientes e principalmente pelo apoio ao projeto.

Ao Diego Simões Barreto, obrigada pelo apoio ao projeto e principalmente por ser esta pessoa especial que sempre tenta ajudar à todos e pela OAPD.

À Pinar, por me ajudar com o inglês, dúvidas, questionamento e muito mais....

Aos amigos do LCT: João, Raphael, Kátia, Larissa, Cristiane e principalmente a Fabiele...obrigada por tudo. E também aos amigos do laboratório do Alyson: Bia, Pinar, Brian, Sarah, Reneta, Fernanda... obrigada por tudo!

À todos os funcionários e técnicos do setor de anatomia da FMVZ/USP.

Ao Jair e Isabel Mastroantonio que sempre me receberam e também me apoiaram nas minhas decisões.

As minhas queridas irmãs, cunhados e sobrinhos por estarem sempre ao meu lado, apoiarem meus sonhos e principalmente por acreditarem em mim.

Aos meus pais por me aturarem, apoiarem e acreditarem nos meus sonhos, mesmo quando meus sonhos parecem ser doidos.

Ao meu querido namorado, não sei o quanto te agradecer por tudo. Obrigada por tudo e principalmente por confiar em mim e deixar realizar os meus sonhos, mesmo quando são planos infalíveis....e também por me esperar nestes 7 meses..... Te amo.

RESUMO

FERNANDES, I. R. **Modelagem neuronal de pacientes com distrofia muscular de Duchenne utilizando células pluripotentes induzidas.** (Neuronal modelling with Duchenne muscular dystrophy patients using pluripotent stem cells). 2015. 100 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

A Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) é uma patologia neuromuscular causada pela mutação ou deleção do gene da distrofina, localizado no cromossomo X, levando a degeneração muscular ao longo da vida do paciente. A doença também tem sido associada a déficit cognitivo e falta de habilidade comportamental. Pesquisas com células neurais de pacientes com DMD poderiam ajudar a elucidar os sintomas neurológicos associados. Neste trabalho, através de células-tronco pluripotentes induzidas (iPSC) derivadas da polpa de dente decíduo esfoliado (SHED) de pacientes com DMD modelamos a DMD produzindo células neurais vivas *in vitro*. A expressão da distrofina foi verificada durante e após a diferenciação neuronal e nos ensaios de imunofluorescência, mostrando que essa proteína está presente em células do SNC. Na análise gênica através do qPCR, a Dp71 e a Dp140, isoformas da distrofina, apresentavam uma expressão menor do que os controles. Além disso, as análises das sinapses baseada na colocalização de marcadores pré e pós-sinápticos (Sinapsina1 e Homer 1) revelaram que os neurônios dos pacientes com DMD tinham menor quantidade de sinapses que os controles, reforçando o papel da distrofina no SNC. Logo, a expressão de genes relacionados a plasticidade sináptica revelou 10 genes alterados nos neurônios dos pacientes DMD, sugerindo que a mutação no gene da distrofina possivelmente altera a plasticidade sináptica e pode estar envolvida na habilidade cognitiva destes pacientes. Desta forma, com base nos nossos achados, a modelagem neuronal de DMD é factível e pode auxiliar a elucidar os mecanismos da fisiopatologia da doença.

Palavras-chave: Distrofia muscular de Duchenne. Distrofina. Modelagem de doenças. SHED. iPSC. Reprogramação celular. Neurônios.

ABSTRACT

FERNANDES, I. R. **Neuronal modelling with Duchenne muscular dystrophy patients using pluripotent stem cells.** (Modelagem neuronal de pacientes com distrofia muscular de Duchenne utilizando células pluripotentes induzidas). 2015. 100 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

The Duchenne muscular dystrophy (DMD) is a neuromuscular disorder caused by a mutation or deletion of the dystrophin gene located on the X chromosome, leading to muscle degeneration throughout the patient's life. The disease has also been associated with cognitive impairment and lack of behavioral skill. Research on neural cells from patients with DMD could help to elucidate the neurological symptoms associated. In this work, through induced pluripotent stem cells (iPSC) derived from dental pulp exfoliated (SHED) of patients with DMD model the DMD producing living neural cells in vitro. The dystrophin expression was observed during and after neuronal differentiation and immunofluorescence assays, showing that this protein is present in CNS cells. In gene analysis by qPCR, the Dp71 and Dp140, isoforms of dystrophin, had a lower expression than controls. Furthermore, based on analysis of synapses colocalization pre and postsynaptic markers (Synapsin1 and Homer 1) showed that neurons of DMD patients had lower number of synapses controls, supporting a role for dystrophin in the CNS. Finally, the expression of synaptic plasticity related genes was found in 10 genes altered in neurons of DMD patients, suggesting that the mutation of the dystrophin gene possibly alters synaptic plasticity and may be involved in cognitive ability of these patients. Finally, based on our findings, neuronal modeling DMD is feasible and may help elucidate the mechanisms of pathophysiology of the disease.

Keywords: Duchenne muscular dystrophy. Dystrophin. Modeling diseases. SHED. iPSC. Cell reprogramming. Neurons.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Estrutura de transcrição do gene da distrofina.....	22
Figura 2 -	A distrofina e o complexo de proteínas associados a distrofina.....	24
Figura 3 -	A expressão da Dp71 e suas diferentes funções.....	28
Figura 4 -	Esquema da localização da Dp71 em astrócitos.....	30
Figura 5 -	Tipos de células-tronco derivadas do dente.....	34
Figura 6 -	Valor das significâncias para análise dos dados do qPCR.....	56
Figura 7 -	Caracterização por imunofluorescência das SHED de pacientes com e sem DMD.....	58
Figura 8 -	Fotomicrografia dos aspectos fenotípicos das colônias de iPSC geradas a partir de SHED.....	61
Figura 9 -	Expressão relativa de genes específicos para células-tronco mesenquimais e células pluripotentes das SHED e iPSC dos pacientes com e sem DMD.....	63
Figura 10 -	Caracterização fenotípica das células progenitores neurais (NPC).....	66
Figura 11 -	Diferenciação neuronal a partir das NPC WT e NPC DMD e caracterização celular.....	69
Figura 12 -	Diferenciação neuronal a partir das NPC WT e NPC DMD e caracterização celular.....	71
Figura 13 -	Análise da expressão dos genes associados a plasticidade sináptica entre neurônios WT e DMD.....	74
Figura 14 -	Análise das medições das conexões neuronais produzidas pelos dos neurônios <i>in vitro</i> de pacientes com e sem DMD.....	75
Quadro 1 -	Anticorpos primários utilizados nos experimentos de imunofluorescência.....	47
Quadro 2 -	Genes utilizados no qPCR.....	50
Quadro 3 -	Valor das significâncias para análise dos dados do qPCR.....	50

Quadro 4 - Clones gerados a partir das iPSC denominados de iWT1, iWT2 e
pacientes DMD, denominados de iDMD1 iDMD2, dois clones de cada
linhagem de células foram gerados e amplificados para a realização
dos experimentos.....59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µl – micro-litros

bFGF-2 - do inglês, *Basic fibroblast growth factor* e do português fator de crescimento de fibroblasto

BSA - do inglês, *Bovine Serum Albumin* e do português albumina sérica bovina

cDNA – ácido desoxirribonucleico complementar

cm³ – centímetro cúbico

c-Myc – do inglês, *Myc proto-oncogene protein*

CO₂- dióxido de carbono

CPD – complexo de proteínas associados a distrofina

CPK - creatinofosfoquinase

DAPI- 4',6-diamidino-2- phenylindol

DMD – Distrofia Muscular de Duchenne

DMEM – do inglês, *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

Dp – produto da distrofina

DPBS - do inglês, *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline* e do português Dulbecco tampão salina-fostato

EB - do inglês, *embryonic bodies* e do português corpos embriões

ES – do inglês, *embryonic stem cell* e do português, célula-tronco embrionária

g - força g

h- horas

iPSC - do inglês, *induced pluripotent stem cell* e do português células pluripotentes induzidas

kDa – kilodanton

Klf4 – do inglês, *Kruppel-like factor 4*

KSR - do inglês, *Knockout Serum Replacement*

MAP2 - do inglês, *Microtubule-associated protein 2* e do português proteína associada a microtubulos

Mb – mega base

MEF- do inglês, *Mouse Embryonic Fibroblast* e do português camada de sustentação de fibroblasto

mim - minutos

mL- mililitro

mm- milímetro

Nanog- do inglês, *nanog homeobox*, em referência à *Tir Nan Og*

NG - do inglês, *Neural growth (media)*, do português, *meio de crescimento neural*

NPC - do inglês, *Neural Progenitor Cells* e do português células progenitoras neurais (CPN)

°C – Grau Celcius

Oct-3/4- do inglês, *octamer 4*

PBS - do inglês, *Phosphate Buffered Saline* e do português tampão salina-fostato

PCR – do inglês, *polymerase chain reaction* e do português reação em cadeia da polimerase

Ri inibidor de Rock e do inglês Rock inibitor

RNA – ácido ribonucleico

rpm - rotações por minuto

SFB - do inglês *Serum fetal bovine* e do português, *Soro Fetal Bovino*

SFBi – soro fetal bovino inativado

SHED – do inglês *Stem cell from human exfoliated deciduous teeth*, Células-tronco de dente decíduo esfoliado

SNAP25 – do inglês Synaptosomal-associated 25 protein e do português, Proteína 25 associada a sinaptossoma

SNC - Sistema nervoso central

Sox2 – do inglês, *SYR (sex determining region Y) – box2*

TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

WT- do inglês, *Wild type* e do português, controle

µm- micrometros

µM- micromolar

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	20
2.1	A DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE E A DISTROFINA.....	21
2.2	A DISTROFINA NO CÉREBRO E A DP71.....	26
2.3	A DMD VISTA POR OUTRO ÂNGULO: DAS ALTERAÇÕES CEREBRAIS ÀS SUAS ASSOCIAÇÕES COM OUTRAS DOENÇAS.....	31
2.4	CÉLULAS DA POLPA DENTÁRIA COMO FONTE DE CÉLULAS MESENQUIMAIS.....	33
2.5	CÉLULAS PLURIPOTENTES INDUZIDAS (IPSC) E A MODELAGEM DE DOENÇAS.....	34
2.6	CÉLULAS PLURIPOTENTES INDUZIDAS (IPSC) E A DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE (DMD).....	36
3	OBJETIVOS.....	37
3.1	OBJETIVO GERAL.....	38
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	38
4	MATERIAS E MÉTODOS.....	39
4.1	COLETA E CULTIVO DAS CÉLULAS-TRONCO DE DENTE DECÍDUO ESFOLIADO (SHED) DE PACIENTES COM E SEM DMD.....	40
4.1.1	Criopreservação das células-tronco de dente decíduo esfoliado (SHED).....	41
4.2	INVESTIGAÇÃO DA PRESENÇA DE MICOPLASMA NA CULTURA DE CÉLULAS-TRONCO DE DENTE DECÍDUO ESFOLIADO (SHED).....	42
4.2.1	Teste de micoplasma por PCR (reação em cadeia da polimerase).....	42
4.2.2	Tratamento das células-tronco de dente decíduo esfoliado (SHED) com Plasmocina.....	43
4.3	GERAÇÃO DE CÉLULAS PLURIPOTENTES INDUZIDAS (iPSC) A PARTIR DAS CÉLULAS-TRONCO DA POLPA DE DENTE DECÍDUO ESFOLIATIVO (SHED).....	43
4.4	DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS REPROGRAMADAS (iPSC) EM CORPOS EMBRIÓIDES (EB) E CÉLULAS PROGENITORAS NEURONAIS (NPC).....	44

4.4.1	Cariotipagem por banda-G.....	45
4.5	DIFERENCIAÇÃO NEURONAL.....	45
4.6	CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA E MOLECULAR DAS CÉLULAS-TRONCO DE DENTE DECÍDUOS ESFOLIADOS (SHED), iPSC, NPC E NEURÔNIOS DE PACIENTES COM E SEM DMD.....	46
4.6.1	Análise da expressão de marcadores por ensaio de imunofluorescência das células SHED, iPSC, NPC e neurônios de pacientes com e sem DMD.....	46
4.6.2	Análise da expressão de marcadores gênicos das células SHED, iPSC, NPC e neurônios de pacientes com e sem DMD por qPCR.....	48
4.7	PLASTICIDADE SINÁPTICA DAS CÉLULAS NEURONAIS DE PACIENTES COM E SEM DMD POR QPCR.....	51
4.8	QUANTIFICAÇÃO DE SINAPSES DAS CÉLULAS NEURONAIS DE PACIENTES COM E SEM DMD.....	51
4.9	CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL ATRAVÉS DA MEDIÇÃO DAS CONEXÕES NEURONAIS.....	52
5	RESULTADOS.....	53
5.1	ANÁLISE DO CULTIVO E CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO DE DENTE DECÍDUO ESFOLIADO (SHED).....	54
5.1.1	Análise da presença da bactéria Micoplasma nas células-tronco de dente decíduo esfoliado (SHED).....	54
5.1.2	Análise do fenótipo celular das células-tronco de dente decíduo esfoliado (SHED).....	57
5.2	GERAÇÃO E SELEÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO PLURIPOTENTES INDUZIDAS (iPSC) A PARTIR DAS CÉLULAS-TRONCO DE DENTE DECÍDUO ESFOLIADO (SHED).....	59
5.2.1	Análise do fenótipo celular das iPSC.....	60
5.2.2	Análise da expressão gênica nas iPSC.....	62
5.3	PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS PROGENITORAS NEURONAIS (NPC).....	64
5.3.1	Análise do fenótipo celular das NPC.....	64

5.4	PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS NEURÔNIOS DE PACIENTES COM E SEM DMD OBTIDOS A PARTIR DA REPROGRAMAÇÃO CELULAR DAS SHED.....	67
5.4.1	Caracterização das sinapses nos neurônios modelados <i>in vitro</i>	70
6	DISCUSSÃO.....	76
7	CONCLUSÃO.....	85
	REFERÊNCIAS.....	87

Introdução

1 INTRODUÇÃO

A forma mais eficaz de lidar e combater uma doença inicia-se no profundo conhecimento da mesma. Para várias patologias contamos com modelos animais que muito se assemelham as doenças encontradas em humanos, mas não contém toda a carga genética dos indivíduos comprometidos, tornando-se difícil estudar principalmente doenças cuja causa genética não está bem estabelecida. Em 2006, um grupo de pesquisadores desenvolveu um método revolucionário, no qual utilizaram vetores retrovirais carregando genes exógenos específicos que promoveram a reprogramação celular de fibroblastos murinos. Estas células passaram a ter aparência e características de células embrionárias e, portanto, foram chamadas de células pluripotentes induzidas (*induced pluripotent stem cells*, iPSC). Esta estratégia começou a ser utilizada como método para produzir células-alvo específicas de determinadas patologias, tornando o método de reprogramação uma ferramenta importante para estudar o mecanismo de diversas doenças, como a Distrofia Muscular de Duchenne (DMD), Síndrome de Rett, Alzheimer, entre outras (PARK et al., 2008; KAZUKI et al., 2010; MARCHETTO et al., 2010).

Neste projeto empregamos a técnica de reprogramação celular para gerar células iPSC a partir de células SHED (BELTRÃO-BRAGA et al., 2011) provenientes de pacientes com DMD e sem DMD (controle). Posteriormente, as iPSC foram diferenciadas em neurônios, para então compararmos os neurônios de pacientes com e sem DMD, levando em consideração que a distrofina (proteína ausente na DMD) tem um papel importante no Sistema Nervoso Central (SNC) (MEHLER, 2000). Células iPSC de pacientes DMD foram geradas anteriormente utilizando fibroblastos (PARK et al., 2008; KAZUKI et al., 2010; LUO et al., 2014), cuja coleta requer um método invasivo acompanhado de procedimento médico (FERNANDES et al., 2014). Portanto, neste projeto, usamos a experiência anterior do grupo (BELTRÃO-BRAGA et al., 2011) e reprogramamos células derivadas de dente decíduo esfoliativo (“dente-de-leite”) de pacientes com e sem DMD, uma importante fonte celular, pois além de serem obtidas sem intervenção porque os dentes caem espontaneamente, são células-tronco mesenquimais (MIURA et al., 2003).

Em tempo, um trabalho modelando neurônios de pacientes com DMD *in vitro* foi realizado a partir de células de fibroblasto fetal de pacientes com DMD com 22

semanas de gestação (LUO et al., 2014). Entretanto, estes neurônios não foram estudados proporcionando maiores entendimentos acerca da doença.

Acreditamos que este trabalho contribuirá com informações valiosas na elucidação da DMD do ponto de vista neurológico. Modelar neurônios DMD *in vitro*, não é somente uma excelente ferramenta que possibilita melhorar a compreensão do papel da distrofina no SNC, mas pode proporcionar uma plataforma personalizada para triagem de medicamentos específicos para cada paciente.

Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE E A DISTROFINA

A Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) é uma doença recessiva ligada ao cromossomo X que acomete aproximadamente 1:3300 nascimentos masculinos, sendo uma das doenças genéticas e pediátricas de maior incidência. É causada pela deficiência da proteína distrofina, sintetizada a partir do gene também chamado de distrofina, que possui 79 éxons, correspondendo a 3.4Mb (Figura 1) (VERHAERT et al., 2011) localizado no cromossomo X na região do p21 (GONZÁLEZ-RAMÍREZ et al., 2008).

A distrofina é um proteína grande que tem tamanho total de 427kDa (kilodalton) conhecida como Dp427 (Dp – produto da distrofina). Existem ainda 3 isoformas derivadas da Dp427, produzidas a partir de três promotores tecido-específicos internos no gene, que são ativados no éxon 2 para a expressão de seus produtos de acordo com o seu peso molecular e sua localização, regulando a sua expressão nos músculos (Dp427m), nas estruturas cerebrais (Dp427c) e nas células de Purkinje (Dp427p) (DAOUD et al., 2009; GALAZ-VEGA et al., 2005). Outras isoformas da distrofina com tamanho parcial também já foram descritas, apresentando 260, 140, 116, e 71kDa, denominados de Dp260, Dp140, Dp116 e Dp71, respectivamente (DAOUD et al., 2006).

A produção das proteínas menores da distrofina ocorre em função da ativação de pelo menos outros 5 promotores internos no gene da distrofina. Apesar de menores, essas proteínas também são funcionais e estão relacionadas ao seu peso molecular e localização. Nas células gliais da retina está presente a Dp260 (sintetizada a partir do éxon 30), nas células do cérebro e dos rins está presente a Dp140 (sintetizada a partir do éxon 44) e nas células do nervo periférico está presente a Dp116 (sintetizada a partir do éxon 56). Já Dp71 (sintetizada a partir do éxon 63) está presente de forma ubíqua nas células do nosso corpo, menos nas células musculares (MEHLER, 2000; MUNTONU et al., 2003; HAENGGI; FRITSCHY, 2006). Mutações nestas proteínas são responsáveis por uma variedade de sintomas associados a DMD (ROBERTS, 2002; GALAZ-VEGA et al., 2005).

Figura 1 – Estrutura de transcrição do gene da distrofina

Fonte: (FLETCHER et al., 2010, adaptado por FERNANDES, I.R., 2014)

Legenda: O gene da distrofina é composto por 79 éxons, sendo que alguma alteração irá levar à uma falha na produção da distrofina, causando a DMD. A distrofina liga-se à alguns sítios específicos como da actina (éxons 1-8) e distroglicano (éxons 63-70), que estarão conectados junto com o citoesqueleto ou a membrana plasmática, respectivamente.

A mais recente descoberta acerca das isoformas da distrofina mostrou existir uma isoforma menor que a Dp71, que até então era considerada como a menor. A menor isoforma é a Dp40, que interage com vesículas pré-sinápticas em neurônios do hipocampo, como a syntaxina e SNAP25 (TOZAWA et al., 2012).

As mutações presentes na DMD podem ocorrer tanto nos éxons quanto nos íntrons (ROBERTS et al., 1993), levando a perda da função da distrofina. Aproximadamente, 60% dos pacientes DMD têm grandes ou pequenas deleções no gene da distrofina, 30% tem duplicações e o restante pode ter mutação pontual introduzindo códons de parada, porém, todos os tipos de mutações levam a perda (parcial ou completa) da produção e diminuição da estabilidade da distrofina (PASSOS-BUENO et al., 1994; MCNALLY et al., 1996; PILGRAM et al., 2010).

Em tempo, a distrofina é uma proteína que está localizada no citoesqueleto do sarcolema dos músculos esqueléticos (Figura 2), onde se associa à várias proteínas transmembrânicas, como distroglicano e sacoglicana, formando o complexo de proteínas associadas a distrofina (CPD). Este complexo é composto por pelo menos 10 proteínas que se associam com a distrofina, sendo essencial para a manutenção da fisiologia e da estrutura normal das fibras musculares (DRAVIAM et al., 2001).

posicionamento dos neurônios, ocorrendo entre DYS-1/distrofina e STN-2/ γ sintrofina nos neurônios GABA, porém, isto não ocorre no músculo. Além disto, os dados genéticos e bioquímicos fornecem evidências que a SAX-2 está ligada ao complexo DYS-1/distrofina via STN-2/ γ sintrofina (complexo necessário ao neurônio). A associação entre distrofina e a actina do citoesqueleto, provavelmente fornecem ancoragem para a SAX-7, regulando assim, sua atividade na manutenção da posição neuronal (ZHOU; CHEN, 2001).

Os pacientes são aparentemente normais ao nascimento, porém ao se aproximarem dos 3 a 5 anos de idade começam a surgir os primeiros sintomas, como fraqueza muscular e degeneração da musculatura esquelética (ANDERSON et al., 2002). Os acometidos pela doença vão perdendo aos poucos a habilidade motora, de modo que ao redor dos 10 anos estão confinados a uma cadeira de rodas. Nas fases mais adiantadas da doença, os pacientes se tornam dependentes de terceiros para todas as atividades e, se não tiverem um atendimento especial, a morte ocorre em geral por volta da segunda década por insuficiência cardíaca ou respiratória já que o diafragma também fica comprometido (EMERY, 1993). Importante salientar que, com o avanço da medicina, muitos pacientes estão alcançando uma maior sobrevida (MOURA et al., 2015) principalmente pelo recurso de ventilação noturna (PASSAMANO et al., 2012; RALL; GRIMM, 2012), no qual os pacientes tinham sobrevida média de 20 anos, passando para 27 anos.

O diagnóstico inicial dos pacientes DMD se dá por observação clínica pelo aumento da panturrilha (BEENAKKER et al., 2002) seguido de fraqueza muscular. Além disso, exames laboratoriais como creatinofosfoquinase (CKP) e biópsia muscular, são requeridos para a confirmação da DMD. A CKP apresenta aumentada nos pacientes com distrofia muscular, além de não apresentarem a distrofina na biópsia muscular (LAING et al., 2011). Outros exames genéticos são necessários para a verificação da região mutada no gene da distrofina, podendo ser feita por PCR multiplex (CHAMBERLAIN et al., 1988), MLPA (*multiplex ligation-dependent probe amplification*) detecta e também por array-CGH (oligonucleotide-based array comparative genomic hybridisation) e também sequenciamento do DNA do pacientes (LAING et al., 2011).

2.2 A DISTROFINA NO CÉREBRO E A DP71

Em 1868, Duchenne em sua primeira descrição da DMD, observou que alguns pacientes apresentavam um déficit cognitivo, descrevendo que apresentavam “inteligência obtusa” (CYRULNIK; HINTON, 2008). Atualmente, sabe-se que a distrofina tem um papel fundamental no Sistema Nervoso Central (SNC), e que cerca de um terço dos pacientes possuem déficit cognitivo (PILGRAM et al., 2010). O déficit pode ocorrer pela ausência ou a mutação da distrofina no SNC, resultando em alteração neuronal e na arquitetura cerebral (ANDERSON et al., 2002). Diversos estudos mostram que a distrofina está presente no cérebro, e sua ausência durante o desenvolvimento do SNC perturba a eficiência dos caminhos cérebro-cerebelo, resultando no déficit cognitivo observado nos pacientes com DMD (CYRULNIK; HINTON, 2008).

O cerebelo, desempenha as funções de aprendizagem motora e cognitiva e sua estrutura é formada por 3 camadas: a molecular, as células de Purkinje e a camada granular. Estudos indicam que a DMD pode ser uma desordem cerebelar, podendo o paciente com DMD apresentar dificuldades em testes que requerem atenção e repetição verbal, além de terem déficits no processamento fonoaudiológico e na leitura (CYRULNIK; HINTON, 2008; KREIS et al., 2011). Estudos imunohistoquímicos realizado em camundongos normais mostraram que a distrofina está localizada no córtex cerebral, no hipocampo e também no cerebelo (LIDOV et al., 1990, 1993; HUARDAND; TREMBLAY, 1992; KIM et al., 1995); regiões que em camundongos *mdx* (um dos modelos para estudos da DMD) apresentaram pouca presença da distrofina (LIDOV et al., 1990). A ausência de distrofina no cérebro de pacientes DMD e nos camundongos *mdx* resulta em deficiências cognitivas (SNOW; ANDERSON; JAKOBSON, 2013).

A distrofina também foi localizada nas densidades dos neurônios pós-sinápticos, onde estas estruturas são altamente enriquecidas, levando assim, a especulação de que esta proteína está envolvida no funcionando sináptico, desempenhando um papel crucial para a plasticidade sináptica (VAILLEND et al., 1999; CYRULNIK; HINTON, 2008; MINCIACCHI et al., 2010).

A Dp71, isoforma da distrofina também conhecida como Apodistrofina-1, é o produto do gene da distrofina mais abundante no cérebro adulto (LEDERFEIN et al.,

1992; JUNG et al., 1993; DAOUD et al., 2009). A distrofina foi localizada em neurônios do córtex cerebral, hipocampo e cerebelo colocalizados com receptores GABA (LIDOV et al., 1993) nas densidades pós sinápticas (SNOW; FRY; ANDERSON, 2013). O cerebelo é responsável pela habilidade motora e também pela cognição e nele, a distrofina é presente pela sua isoforma total, conhecida por Dp427c localizada no neurônios Purkinge. A perda da distrofina nestes neurônios levam à sequelas neurofisiológicas (CYRULNIK; HILTON, 2008; SNOW; FRY; ANDERSON, 2013). Em camundongos, a maior expressão mRNA para Dp71 foi encontrado no córtex cerebral, no hipocampo e no bulbo olfatório (ANDERSON et al., 2002; CYRULNIK; HILTON, 2008; DAOUD et al., 2009).

A função da Dp71 está relacionada com sustentação das proteínas a fim de estruturar e sinalizar estas proteínas, podendo exercer esta função durante a adesão celular, na membrana do núcleo, divisão celular e na arquitetura neuronal (FORT et al., 2008; WAITE; BROWN; BLAKE, 2012; TADAYONI et al., 2012). Além disso, a Dp71 é o primeiro gene detectável durante o desenvolvimento embrionário, expresso nas células-tronco pluripotentes embrionárias (TADAYONI et al., 2012). Diferentemente da Dp71, a Dp140 é expressa durante o desenvolvimento do cérebro fetal e possivelmente está relacionada ao funcionamento neuropsicológico (MOIZARD et al., 1998; FELISARI et al., 2000; CHAMOVA et al., 2013). Mutações nas regiões mais distais da distrofina (a exemplo as Dp140 e Dp71) estão relacionadas a perda de cognição (MOIZARD et al., 1998).

Na retina, a Dp71 controla a expressão e a sublocalização dos canais de potássio e água nas células da glia. Já na adesão celular, a Dp71 modula as β -integrinas, modulando a migração neuronal e a sinaptogênese durante o desenvolvimento do SNC. Durante a mitose, a Dp71 liga-se ao β -dystroglycano e a laminina nos pólos mitóticos para regular suas localizações e estabilidade. Ainda, no núcleo celular a Dp71 tem a função de estabilizar o envelope nuclear, envolvido com expressão de gene, reparação de DNA, entre outros (Figura 3). (TADAYONI et al., 2012; WAITE; BROWN; BLAKE, 2012).

Ainda, a Dp71 pode codificar múltiplas proteínas por ser uma proteína C-terminal da distrofina e pode sofrer *splice* alternativo, produzindo outras isoformas da Dp71 que estarão relacionadas a sua localização celular. Entre essas isoformas da Dp71, a Dp71d e a Dp71f são encontradas no cérebro. A Dp71d é comumente expressa nos núcleos e não apresentam os éxons 71 ou 78, enquanto a Dp71f é expressa na

membrana celular e não apresenta os éxons 71 e 78 (GONZÁLEZ-RAMÍREZ et al., 2008). Essas isoformas já foram detectadas durante o processo de diferenciação neuronal das células PC12 (células da glândula adrenal de rato - CERNA et al., 2009; BENABDESSELAM et al., 2012). A Dp71f também está presente em astrócitos GFAP positivos (SZABÓ et al., 2004).

Figura 3 – A expressão da Dp71 e suas diferentes funções

Fonte: (TADAYONI et al., 2012, adaptado por FERNANDES, I.R., 2014)

Legenda: A Dp71 está presente de forma ubíqua em nosso organismo e por isto, apresenta várias funções. A) Presença da Dp71 nas células gliais da retina cuja função é expressão e localização dos canais de Potássio (Kir 4.1) e de Cálcio (AQP4)(A), B) DP-71 associada com β-distroglicano e laminina participando da adesão celular, (C) Ligação da DP-71 ao β-Distroglicano e a Laminina, contribui para localização e estabilização dos centrôssomos no polo mitótico durante a mitose, (D) A Dp71 liga-se a laminina no nucleoplasma e a Sintrofina e ao β-distroglicano estabilizando a membrana intracelular nuclear.

Aproximadamente um terço dos pacientes com DMD podem apresentar déficit cognitivo (LIDOV, 1996; DAOUD et al., 2009). A falta da Dp71 no SNC foi relacionada com o déficit cognitivo, pois pacientes com mutações localizadas no Dp71 apresentaram déficit cognitivo severo (DAOUD et al., 2009). A Dp71 pode estar relacionada a este deficit, pois está associada ao desempenho no papel na sinapse glutamatérgica, na organização e no funcionamento em várias células do cérebro (DAOUD et al., 2009) e ainda, em alterações cerebrais, como desordem na arquitetura, perda neuronal, gliose, entre outras (ANDERSON et al., 2002).

A Dp71 também está presente nos astrócitos (Figura 4), ligada com a sintrofina e a α -distrobrevina 1 (ambas proteínas do CPD) que ancoram a aquaporina4, presentes em astrócitos perivascular ao redor dos vasos sanguíneos (DAOUD et al., 2009; WAITE; BROWN; BLAKE, 2012). Além da função de sustentação, a Dp71 também exerce a função de localização dos canais de aquaporina e o canal de potássio (Kir 4.1) (ILARRAZA-LOMELI et al., 2007). A aquaporina é uma proteína de transporte de água e está colocalizada com a Kir 4.1, sendo que ambas tem a função de homeostase no cérebro e nas células gliais da retina. A perda de Dp71 nos astrócitos pode levar a desestabilização de água e potássio no cérebro e na retina, causando diversos danos ao paciente como grande estresse de sensibilidade na retina (FORT et al., 2008) e edema cerebral (WAITE; BROWN; BLAKE, 2012).

A Dp71 também foi detectada e expressa ao redor dos vasos sanguíneos cerebrais em cultura de astrócitos de ratos (ALEMÁN et al., 2001) e nas células gliais de Muller na retina de camundongos (DALLOZ et al., 2003), sugerindo ainda um papel da Dp71 na função da barreira hematoencefálica (DAOUD et al., 2009).

Figura 4 – Esquema da localização da Dp71 em astrócitos

Fonte: (WAITE; BROWN; BLAKE, 2012, adaptado por FERNANDES, I.R., 2014)

Legenda: A) Localização dos astrócitos ao redor dos vasos sanguíneos. B) Nos astrócitos, a Dp71 exerce a função de sustentação e localização dos canais de aquaporina, contribuindo para a homeostase no cérebro e nas células da retina.

2.3 A DMD VISTA POR OUTRO ÂNGULO: DAS ALTERAÇÕES CEREBRAIS ÀS SUAS ASSOCIAÇÕES COM OUTRAS DOENÇAS

Nos pacientes com DMD, há evidências da arquitetura desordenada do SNC, alterações nos dendritos e perda dos neurônios, quando comparado com neurônios que expressam a distrofina.

Além de anomalias estruturais, há evidências que indicam o funcionamento alterado do cérebro em humanos e em animais com DMD (ANDERSON et al., 2002). Em humanos, a DMD está associada com anormalidades metabólicas do cérebro (TRACEY et al., 1995). Além disso, o metabolismo reduzido da glicose tem sido encontrado em áreas normalmente ricas em distrofina, incluindo o cerebelo (LEE et al., 2002).

Necropsias e escaneamento do cérebro de pacientes com DMD tem sido estudados para verificar alterações anormais na morfologia, estrutura e bioquímica. Um estudo realizado por Dubowitz e Crome (1969) encontrou apenas um paciente entre 21 com DMD com anormalidade cerebral, mas conclui que a DMD não estava associada a essa anormalidade. Entretanto, contradizendo esse estudo, outros pesquisadores relataram anormalidades associadas a DMD, como perda neuronal, heteropatas, gliosis, emaranhados neurofibrilares, perda de células Purkinje, anormalidades nos dendritos, arquitetura desordenada, entre outras (ROSMAN; KAKULAS, 1966; JAGADHA; BECKER, 1988; ITOH et al., 1999).

Estudos também realizados através de necropsias de pacientes com DMD, verificaram que houve pouca presença da distrofina nas densidades pós-sinápticas do córtex cerebral (KIM et al., 1995) e também a ausência completa da distrofina nos neurônios cerebrais e cerebelares (UCHINO et al., 1994). Além anomalias estruturais, há evidências que indicam o funcionamento alterado do cérebro em humanos e animais com distrofia muscular (ANDERSON et al., 2002).

A DMD está associada com anormalidades metabólicas do cérebro (TRACEY et al., 1995). Além disso, o metabolismo reduzido da glicose tem sido encontrado em áreas normalmente ricas em distrofina, incluindo o cerebelo, estruturas temporais mediais, área sensório-motora e neocórtex temporal (LEE et al., 2002).

Recentemente, um estudo realizado em 30 pacientes com DMD demonstrou que estes pacientes possuem redução tanto da matéria branca quanto na cinzenta,

quando comparados com os pacientes controle não portadores da doença, afetando todo o cérebro (DOORENWEERD et al., 2014). O mesmo estudo ainda sugeriu que a Dp140 tem um papel fundamental durante o desenvolvimento cerebral.

Estudos comportamentais mostraram que meninos com DMD podem ter déficit cognitivo e QI abaixo da média, enquanto que os camundongos *mdx* exibiam uma diminuição na memória em curto prazo (ANDERSON et al., 2002). Pesquisas indicam que pacientes com DMD têm extensão verbal limitada, dificuldade em testes que necessitam de atenção e repetição de fala, recordação histórica, entre outros (HINTON et al., 2000; 2004; 2007; BILLARD et al., 2002; CYRULNIK; HINTON, 2008).

Segundo Mehler (2000), os pacientes com DMD apresentam significativo desenvolvimento cognitivo e alterações comportamentais, incluindo o aumento da frequência de espectro de autismo e desordem de déficit de atenção. Estudo realizado por Hendriksen e Vles (2008) mostrou que 3,1% dos meninos com DMD apresentavam autismo. Já em outro estudo, realizado em 2009 por Hinton et al., relata que 19% dos pacientes apresentavam autismo. Para Wu et al. (2005), a associação de Distrofia Muscular de Duchenne com transtorno do espectro do autismo está envolvida por diferentes mecanismos. Em primeiro lugar, pode haver uma região específica dentro do gene da distrofina que é alterada ou ainda a formação de um proteína truncada. Essa distrofina alterada, teoricamente, poderia existir tanto no músculo quanto no SNC, resultando na deficiência da aprendizagem ou no transtorno do espectro do autismo.

O Projeto Genoma Autismo realizado por Pagnamenta et al. (2011) descreve que uma família apresentava características genotípica e fenotípica de autismo, ocorrendo duplicação dos éxons 31-44 do gene da distrofina e uma rara deleção dos éxons 1-9 do TRPM3, sugerindo que estes dados são consistentes com duplo diagnóstico entre autismo e distrofia muscular e indicando que o fundo genômico, assim como a posição da mutação no gene DMD podem ter impacto sobre as correlações neurológicas.

Por fim, a importância da distrofina no cérebro está diretamente ligada ao déficit cognitivo e desordens neuropsiquiátricas, como o autismo, esquizofrenia e, que podem estar presente em pacientes DMD.

2.4 CÉLULAS DA POLPA DENTÁRIA COMO FONTE DE CÉLULAS MESENQUIMAIS

As células-tronco mesenquimais (MSCs) são um grupo heterogêneo de células multipotentes, que podem ser isoladas de diversas fontes como a medula óssea, placenta, cordão umbilical (WEBER et al., 2010), tecido adiposo e dos dentes decíduos esfoliados, além de ter a capacidade de se diferenciarem em diversas linhagens como osteogênica, condrogênica, adipogênica, miogênica e neurogênica (CONRAD; HUSS, 2005; POUNTOS; PETER, 2005). A partir do estudo de células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea, foram definidos critérios de identificação: células-tronco mesenquimais são aderentes ao plástico em condições de cultura padrão, expressam genes que geram moléculas como CD105, CD73 e CD90, não expressam genes que geram moléculas como CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79 α e CD19 e do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) classe II, o receptor de superfície de células HLA-DR e são capazes de se diferenciar em osteoblastos, adipócitos e condroblastos *in vitro* (DOMINICI et al., 2006). Além disso, é atribuído às células-tronco mesenquimais função imunomoduladora, importante à se considerar para aplicações clínicas destas células (SORRELL; CAPLAN, 2010).

Os dentes podem ser boas fontes de células-tronco mesenquimais. Os dentes se desenvolvem a partir do ectoderma oral e do mesenquima da crista neural (tecido embrionário transitório), o que dá origem a células-tronco da crista neural pós-migratória (NCSCs) (LA NOCE et al., 2014). Os ensaios voltados para pesquisas utilizando células-tronco com origem na estrutura dentária foram capazes de caracterizar cinco fontes diferentes de obtenção de células-tronco: células-tronco progenitoras do folículo dental (CTPFD), células-tronco de dente decíduos esfoliados (no inglês: *stem cell from human exfoliated deciduous teeth*, SHED), células-tronco de polpa dentária (CTPD), células-tronco de ligamento periodontal (CTLP) e as células-tronco da papila apical (CTPA) (HUANG et al., 2009; KARAMZADEH; ESLAMINEJAD, 2013), como ilustrado na figura 5. Acredita-se que mesmo localizadas dentro de uma única unidade funcional, as origens diferentes de cada grupo lhes conferem características distintas (HUANG et al., 2009; GRONTHOS et al., 2000).

As células-tronco de origem dental, principalmente provenientes de dente decíduo esfoliado, tem sido alvo de interesse por parte de inúmeros grupos de pesquisadores nos últimos anos. Esse fato é creditado também devido a facilidade de obtenção, pois normalmente as células são coletadas após queda do dente, além de serem excelente fonte para gerar células pluripotentes induzidas (BELTRÃO-BRAGA et al., 2011; GRIESI-OLIVEIRA et al., 2014).

Figura 5 – Tipos de células-tronco derivadas do dente

Fonte: (KARAMZADEH; ESLAMINEJAD, 2013, adaptado por Fernandes, I.R. 2014)

Legenda: Durante a formação e o desenvolvimento do dente, há presença de diversos tipos de células-tronco: progenitoras do folículo dental (CTPFD); dente decíduo esfoliado (SHED); polpa dentária (CTPD); ligamento periodontal (CTLP) e da papila apical (CTPA).

2.5 CÉLULAS PLURIPOTENTES INDUZIDAS (IPSC) E A MODELAGEM DE DOENÇAS

Em 2006, Takahashi e Yamanaka desenvolveram um método para reprogramar os fibroblastos murinos da pele, transformando-os em células semelhantes as embrionárias (ES) utilizando quatro vetores retrovirais carregando genes específicos, Oct4, Sox2, Klf4 e c-Myc. As células geradas foram chamadas de células-tronco pluripotentes induzidas (do inglês *induced pluripotent stem cells*, iPSC). Além da técnica gerar células pluripotentes semelhantes as embrionárias, contornando os dilemas morais e éticos mencionados em relação ao uso das células obtidas a partir de embriões, as iPSC são grandes candidatas a aplicação na medicina regenerativa,

pois evitariam o problema de histocompatibilidade, já que as células usadas na terapia celular seriam autólogas. Além disso, como as iPSC se comportam de forma semelhante às células-tronco embrionárias, elas são capazes de se diferenciarem em células oriundas de qualquer um dos três folhetos embrionários, ectoderma, mesoderma e endoderma (BELTRÃO-BRAGA et al., 2011). Isso torna possível diferenciar *in vitro* tipos de células especializadas que são afetadas em certa doença, gerando uma nova forma de estudar os mecanismos celulares e moleculares envolvidos na patologia da doença em condições controladas. Por isso, as iPSCs podem ser usadas para melhor compreender os mecanismos biológicos de várias doenças (BELTRÃO-BRAGA et al., 2013).

A partir desta ferramenta, diversos grupos de pesquisadores começaram a explorar e estudar os mecanismos de várias doenças, principalmente neurodegenerativas e do neurodesenvolvimento, permitindo inclusive testar o efeito de medicamentos *in vitro* nas células alvo da doença estudada (MARCHETTO et al., 2008; 2010; GRIESI-OLIVEIRA et al., 2014). O mais importante, é o fato de que essas células possuem o mesmo material genético das células originais, especialmente interessante para estudar doenças genéticas cuja causa ainda não está elucidada (MARCHETTO et al., 2008).

Estudos que geram células específicas a partir de células iPSC foram chamados de modelagem de doenças. A modelagem de doenças através da produção e diferenciação de iPSC tem aumentado notoriamente desde sua primeira publicação, que usou a tecnologia para melhor compreender a Atrofia Muscular Espinhal (AMS). O grupo americano derivou e caracterizou células iPSC dos pacientes com AMS e derivou neurônios motores *in vitro* (EBERT et al., 2008). Desde então, diversos grupos de pesquisadores vem modelando doenças como, por exemplo, anemia de Falconi (RAYA et al., 2009), diabetes tipo 1 (MAEHR et al., 2009), síndrome do X frágil (URBACH et al., 2010), síndrome de Angelman (CHAMBERLAIN et al., 2010), esquizofrenia (BRENNARD et al., 2011), Alzheimer (YAHATA et al., 2011), síndrome de Timoty (PASCA et al., 2011), doença de Huntington (CAMNASIO et al., 2012) e alguns trabalhos mostraram que além de modelar é possível testar efeito de medicamentos *in vitro*, como feito para Síndrome de Rett (MARCHETTO et al., 2010) e autismo (GRIESI-OLIVEIRA et al., 2014).

2.6. CÉLULAS PLURIPOTENTES INDUZIDAS (IPSC) E A DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE (DMD)

Células humanas de pacientes com DMD já foram reprogramadas anteriormente utilizando retrovírus e os “4 fatores de Yamanaka” (PARK et al, 2008; JANG et al., 2012; LUO et al., 2014; GUAN et al., 2014), bem como vírus não integrativo (Li et al., 2015). Entretanto, em apenas um desses trabalhos houve a produção de iPSC de pacientes com DMD e a intenção de modelar a doença, onde os autores diferenciam as células em neurônios, porém não fizeram estudos funcionais (LUO et al., 2014).

As iPSC também podem ser usadas como modelos celulares para terapia celular autóloga, sendo aliás esse o objetivo inicial do desenvolvimento da tecnologia de reprogramação desenvolvido por Yamanaka e seu grupo em 2006. Com vistas a essa possibilidade em humanos, doenças com fundo genético precisariam primeiro corrigir a alteração genética para depois realizar a terapia com células derivadas das iPSC (Raya et al., 2009). Recentemente, foi realizado um estudo visando a correção genética do gene da distrofina utilizando iPSC derivadas de fibroblastos de camundongo *mdx*. Neste estudo, a correção da distrofina foi feita utilizando um vetor episomal de cromossomo artificial humano carregando o gene humano da distrofina completo (427kDa) por transferência de cromossomos. Neste caso, a deleção ocorria entre os éxons 4 ao 43 do gene da distrofina que após o procedimento de terapia gênica foi restaurada (KAZUKI et al., 2010). Entretanto, neste trabalho, a iPSC foi gerada a partir de células de camundongo e vetor humano, não usando células humanas de pacientes com DMD, portanto só testando a prova do princípio do trabalho.

A restauração da distrofina por terapia gênica também foi realizada com sucesso utilizando a tecnologia de TALEN e CRISPR-Cas9 a partir de iPSC derivadas de pacientes com deleção no éxon 44 do gene da distrofina. Neste trabalho as iPSC submetidas as terapias acima foram diferenciadas em células miogênicas, na qual apresentaram a distrofina não alterada mostrando a correção gênica da mesma. Este trabalho abre novas alternativas terapêuticas para a doença onde uma possível correção genética *ex vivo* da distrofina pode ser utilizada no futuro (LI et al., 2015).

Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve como objetivo induzir a reprogramação de SHED de pacientes com DMD, utilizando vetores virais carregando genes específicos e a partir das células reprogramadas (iPSC) e, então, produzir neurônios a fim de estudar as características morfológicas e fisiológicas dessas células, modelando *in vitro* a DMD no que tange ao sistema nervoso.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Coleta e cultivo das SHED de paciente com e sem DMD
- Caracterização das células da SHED de pacientes com e sem DMD
- Reprogramação e obtenção de iPSC a partir das células da SHED de pacientes com e sem DMD
- Caracterização das iPSC geradas a partir das SHED de pacientes com e sem DMD
- Produção de células progenitoras neurais (do inglês *neural progenitor cell*, NPC) a partir das iPSC
- Diferenciação das NPC em neurônios de pacientes com e sem DMD
- Caracterização morfológica, molecular e funcional dos neurônios produzidos de pacientes com e sem DMD.

Materiais e Métodos

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Para a realização deste projeto foram utilizados os materiais e os métodos descritos a seguir.

4.1 COLETA E CULTIVO DAS CÉLULAS-TRONCO DE DENTE DECÍDUO ESFOLIADO (SHED) DE PACIENTES COM E SEM DMD

Para a realização deste projeto, foram obtidas células SHED de pacientes com DMD (nomeadas de SHED DMD ou apenas DMD) e de pacientes sem DMD, denominado de controle (do inglês *wild type*, WT, nomeados de SHED WT ou apenas WT).

Para tanto, este projeto foi aprovado no Comitê de Ética em pesquisas em seres humanos do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de São Paulo (Parecer 1001) e também pelo Comitê de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da mesma Universidade (3150/2013), local onde o projeto foi executado. As SHED foram obtidas a partir dos dentes decíduos esfoliados, coletados a partir de doações voluntárias de pacientes com e sem DMD, mediante informe, ciência e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) do “Projeto A Fada do Dente, coordenado pela Profa. Dra. Patrícia Beltrão Braga. Após a queda espontânea ou mediante a retirada em consultório dentário, o dente decíduo esfoliado foi enviado para o Laboratório de Células-Tronco (LCT) do Departamento de Cirurgia da FMVZ/USP dentro de um tubo contendo meio de transporte, composto por DMEM (LGC Biotecnologia, Cotia, São Paulo) suplementado com 5% solução de antibiótico-antimicótico (500U/mL penicilina, 500µg/mL estreptomicina e 2,5µg/mL anfotericina – Sigma, SL, USA) e 1% soro fetal bovino comum (SFB - Invitrogen, CA, USA), sob temperatura de 4°C.

O dente foi processado usando protocolo de Miura et al. (2003) modificado. Após a lavagem do dente por 3 vezes em PBS 1% contendo 5% da solução de antibiótico-antimicótico, a polpa foi retirada com auxílio de agulha (22G x 3 1/2"- BD, NJ, USA), lavada novamente com PBS e digerida com Colagenase tipo I (3mg/mL- Invitrogen)

em PBS por 30 minutos em banho-maria. Passados os 30 minutos, a ação da enzima foi bloqueada utilizando meio de cultura para SHED contendo SFB e então foi feita uma centrifugação por 5 minutos a 200g. O precipitado foi ressuspensionado em meio de cultura SHED contendo α -MEM (LGC Biotecnologia) suplementado com 5% de soro fetal bovino inativado (SFBi, Invitrogen), 1% de aminoácidos não essenciais (MEM NEAA - Invitrogen), 1% L-Glutamina (Invitrogen) e 100U/mL de penicilina, 100 μ g/mL de estreptomicina e 0,025 μ g/mL de anfotericina e colocado em placa de cultura de 60mm. As SHED foram mantidas em estufa a 37 °C com 5% CO₂.

4.1.1 Criopreservação das células-tronco de dente decíduo esfoliado (SHED)

O procedimento de congelamento foi iniciado com a lavagem das células com PBS, seguida de tripsinização utilizando 0,5mL de *Tryple Express* (Invitrogen) para a placa de 60mm ou 1mL para a placa de 100mm, durante 5 minutos na estufa. Após o descolamento das células da superfície da placa de cultivo, essas foram ressuspensionadas em 3mL de meio de cultivo SHED, transferidas para um tubo cônico de 15mL e submetidas à centrifugação por 5 minutos a 200g. Após centrifugação, o precipitado formado foi ressuspensionado em solução de congelamento contendo 90% de SFB (Invitrogen), e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO – LGC Biotecnologia). Em seguida, os criotubos foram colocados no *mister frost* (Thermo Scientific, MA, USA) e mantidos por 24h em freezer -80 °C (Thermo Scientific, MA, USA) e, posteriormente transferidos ao nitrogênio líquido. Após 45 dias do congelamento, as células foram descongeladas rapidamente em banho-maria a 37°C e colocadas em meio SHED previamente aquecido a 37 °C. Em seguida, as células descongeladas foram centrifugadas por 5 min a 200g. O precipitado celular obtido após centrifugação foi ressuspensionado em meio de cultivo SHED e colocados em cultivo com o objetivo de analisar se as SHED conservavam suas características após congelamento.

4.2 INVESTIGAÇÃO DA PRESENÇA DE MICOPLASMA NA CULTURA DE CÉLULAS-TRONCO DE DENTE DECÍDUO ESFOLIADO (SHED)

As células SHED foram submetidas ao teste de micoplasma para identificar a presença da bactéria *Mycoplasma* por PCR.

4.2.1 Teste de micoplasma por PCR (reação em cadeia da polimerase)

Para este experimento foi necessário coletar 1mL do sobrenadante do meio de cultura das células SHED WT e SHED DMD, após 48h em cultivo, podendo este ser mantido congelado em freezer -20°C. O sobrenadante coletado foi centrifugado por 200g por 10 minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante obtido após centrifugação foi descartado e o precipitado contendo poucas células eucarióticas possivelmente infectadas com micoplasma foi ressuspensionado em 15µL de água Milli-Q autoclavada.

Em seguida, iniciou-se a reação da PCR utilizando 1µL do precipitado previamente ressuspensionado, 10µM de oligonucleotídeos sense e anti-sense: 5'GGCGAATGGGTGAGTAACCG3' e 5'CGGATAACGCTTGCGACCTATG3', respectivamente, que anelam em regiões homologas de genes do micoplasma de várias espécies, 10µM dNTPs, MgCl₂ 50mM, tampão da enzima e 1U de Taq DNA Polymerase (5U/µl) (Invitrogen) e água deionizada para um volume final de 25µl. Esta mistura foi colocada em um termociclador e a reação ocorreu nas seguintes condições: 1 ciclo a 94 °C por 4 min seguidos de 39 ciclos de variações consecutivas de temperatura: 94 °C por 4 min para desnaturação, 60 °C por 30 segundos para anelamento e 72 °C por 45 segundos para polimerização e 1 ciclo extra de 10 min a 72 °C para a extensão final.

Para este experimento foram utilizados controles positivos e negativos da reação bem como água. Aproximadamente 10% do produto desta reação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% e corado com *SYBR Safe DNA Stain* (Invitrogen) para visualização em transiluminador UV (Gel Doc XR, CA, USA). Marcador de peso molecular, *Gene Ruler 100pb DNA Ladder* (Fermentas Life Science, NY, EUA) foram utilizados para confirmar o tamanho esperado dos fragmentos.

4.2.2 Tratamento das células-tronco de dente decíduo esfoliado (SHED) com Plasmocina

Após a confirmação da contaminação das células por micoplasma, as células SHED foram submetidas ao tratamento do Plasmocina (Invivogen, CA, EUA). Para isto, as células foram plaqueadas na placa de Petri de 60mm em baixa confluência e o meio de cultura foi trocado a cada 3 dias com a adição de 25µg/mL de Plasmocina. O tratamento foi acompanhado com a realização de PCR nos dias 6, 10 e 16, para verificação da ausência do micoplasma. Após o tratamento e no mínimo após de 48h de cultivo sem troca de meio, foram coletados os sobrenadantes das células e a PCR foi realizada conforme protocolo descrito no item 4.2.1.

4.3 GERAÇÃO DE CÉLULAS PLURIPOTENTES INDUZIDAS (iPSC) A PARTIR DAS CÉLULAS-TRONCO DA POLPA DE DENTE DECÍDUO ESFOLIADO (SHED)

Após a confirmação que as SHED não apresentavam contaminação com micoplasma, o protocolo de reprogramação celular foi iniciado. A reprogramação celular foi realizada utilizando 2 pacientes DMD (DMD1 e DMD2) e 2 pacientes controle (WT1 e WT2).

As células DMD1, DMD 2, WT1 e WT2 foram plaqueadas em uma placa de 6 poços em quantidades diferentes, $0,5 \times 10^5$, 1×10^5 e 2×10^5 , para cada célula. No dia seguinte ao plaqueamento, as células foram analisadas quanto a sua confluência e apenas o poço de células que apresentava a confluência de 60 - 70% foram utilizados na transdução utilizando o vírus Sendai para os “4 fatores de Yamanaka”: Oct4, c-Myc, Sox2 e Klf4 (Cytotunes - Invitrogen). Quantidades iguais de cada um dos quatro vírus foram aplicadas nas células que foram incubadas por 24 horas na estufa de CO₂. Após incubação, o meio das células foi trocado e as mesmas foram mantidas por 48 horas na estufa a 37 °C, para descanso e recuperação da transdução. Após este período, as células foram tripsinizadas e em seguida, plaqueadas sobre uma camada de células de sustentação derivada de fibroblastos de embrião de camundongo (do inglês, *Mouse Embryonic Fibroblast*, MEF) previamente inativadas com 10µg/mL

mitomicina C (Global Stem, MD, USA) em meio de células alvo, ou seja, meio de SHED. Após 24 horas, o meio foi trocado e o meio TeSR (StemCell Technologies, BC, Canadá) foi adicionado.

As células foram mantidas sobre MEF até o aparecimento e o crescimento das primeiras colônias iPSC. Após esse período, as colônias foram cultivadas sobre uma matriz celular, Matrigel (BD Bioscience, CA, USA), diluído 1:250 em meio DMEM/F12 (Invitrogen) gelado. As colônias foram repicadas conforme a sua necessidade, utilizando o microscópio invertido EVOS (Invitrogen) para visualização. Com o auxílio do EVOS, isolamos aproximadamente 10 clones de cada célula. Destes clones, 2 clones de cada célula que apresentaram a melhor morfologia foram selecionados para a seguir com o protocolo de diferenciação neuronal.

4.4 DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS REPROGRAMADAS (iPSC) EM CORPOS EMBRIÓIDES (EB) E CÉLULAS PROGENITORAS NEURONAIS (NPC)

Colônias de iPSC foram coletadas e plaqueadas em placas de 30mm contendo matrigel (BD Biosciences) e mantidas com meio mTeSR (Stem Cell Technologies). Após obter confluência de aproximadamente 60%, o meio foi trocado para meio N2 (DMEM/F12 suplementado com 1x de N2 - Invitrogen) contendo 1 μ M de Dorsomorfina (Tocris, IO, USA) e 10 μ M de SB431542 (Stemgent, MA, USA). Após 48h de condicionamento, as colônias foram removidas da placa e cultivadas em suspensão em placas de 6 poços sob agitação constante (90 rpm) em placa agitadora mantida em incubadora de CO₂, para a formação de corpos embrióides (do inglês *embryoid bodies*, EB). Os EB foram mantidos durante 5 dias sob agitação constante (90 rpm) em estufa de cultivo celular em meio N2 suplementado contendo Dorsomorfina e SB431542, nas mesmas concentrações indicadas acima.

Passados os 5 dias, os EB foram plaqueados em placa de 60mm contendo Matrigel (vide concentração no item 4.3) para a produção de rosetas neurais (nicho de células progenitoras neuronais) em meio NFG (500mL de meio DMEM/F12 suplementado com 0,5x de N2 (invitrogen), 0,5x de Gem21 (Gemini Bio-products, CA, USA), 20ng/mL de FGF-1 (Invitrogen) e 1 μ g/mL penicilina/estreptomicina). Após 3-4 dias da indução, foi possível observar a formação das rosetas. Entretanto, apenas

com 7 dias de indução, as rosetas foram coletadas em tubo cônico de 15mL, gentilmente dissociadas com o auxílio de pipeta automática e depois, plaqueadas em placa revestidas de 10µg/mL de poli-ornitina (Invitrogen) e 2,5µg/mL de laminina (Invitrogen) acrescidas de meio de cultivo NGF como descrito acima.

A expansão das células progenitoras neuronais (do inglês *Neuronal Progenitor Cells*, NPC) foi realizada de acordo com a necessidade de dissociação da placa, utilizando Accutase (Invitrogen) por 5 minutos em estufa a 37°C. Após esse período, foi feita a inativação com PBS. As células soltas foram contadas em contador automatizado (TC10, BioRad) e plaqueadas na concentração de 1×10^6 em placa de 100mm tratada com poli-ornitina e laminina nas mesmas concentrações citadas acima.

4.4.1 Cariotipagem por banda-G

O cariótipo das células foi checado por banda-G. Para isto, as células NPC em passagem 3 (P3) foram plaqueadas em garrafa de 25cm³ até atingirem confluência de 60%, e então quando foram enviadas para o laboratório especializado neste tipo de exame no *Children's Hospital* em Los Angeles/EUA.

4.5 DIFERENCIAÇÃO NEURONAL

As NPC derivadas das iPSC, foram expandidas usando meio NGF (descrito no item 4.4). Para a diferenciação neuronal, as células NPC foram plaqueadas em placa de 10cm revestidas de poli-ornitina e laminina (descritas anteriormente item 4.4). Após atingirem uma confluência em torno de 60-70%, as NPC foram tratadas com 10µM de inibidor ROCK (Calbiochem, MA, USA) por 48 horas e meio NG (meio NGF, sem a presença de FGF). Passadas as 48h, o meio contendo o inibidor de ROCK foi removido e os neurônios foram mantidos no meio NG durante 28-30 dias. O meio foi trocado cuidadosamente a cada 3 ou 4 dias.

4.6 CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA E MOLECULAR DAS CÉLULAS-TRONCO DE DENTE DECÍDUOS ESFOLIADOS (SHED), iPSC, NPC E NEURÔNIOS DE PACIENTES COM E SEM DMD

Em todas as etapas deste projeto obtenção das SHED, reprogramação (iPSC) e passos para a diferenciação neuronal através da obtenção de NPC e finalmente os neurônios de pacientes com e sem DMD (controle) foram caracterizados biológica e molecularmente conforme os ensaios descritos a seguir.

4.6.1 Análise da expressão de marcadores por ensaio de imunofluorescência das células SHED, iPSC, NPC e neurônios de pacientes com e sem DMD

As SHED, iPSC, NPC e neurônios foram cultivadas de forma diferente para a execução do ensaio de imunofluorescência. As SHED foram cultivadas sob lamínulas de vidro de 13mm em placas de 24 poços, plaqueadas em confluência de $0,05 \times 10^6$ e mantidas até obter 60-70% da confluência. As células iPSC foram coletadas manualmente com auxílio do microscópio EVOS, plaqueadas em câmara plástica de 8 poços (BD, NJ, USA) com Matrigel e mantidas até obter 50-70% da confluência. As NPC foram plaqueadas em lamínulas de vidro de 13mm tratadas com $1 \mu\text{g/mL}$ de poli-ornitina e $5 \mu\text{g/mL}$ de laminina em placa de 24 poços, mantidas até obterem 70-80% da confluência. Os neurônios, conforme descrito acima, foram produzidos a partir das NPC que foram plaqueadas em lamínulas redondas de 13mm tratadas com poli-ornitina e laminina e, após 4 semanas de diferenciação, os neurônios foram submetidos a análise.

Após atingirem a confluência desejada, os meios de cultura foram removidos e as todas as células (SHED, iPSC, NPC e neurônios) foram lavadas com PBS 1x e fixadas em paraformaldeído 4% em PBS por 15 minutos em temperatura ambiente. Passada a fixação, as células foram lavadas 3 vezes com PBS 1x e permeabilizadas com 1% Triton X-100 (Promega, WI, USA) diluído em PBS por 15 minutos. Em seguida, foram bloqueadas com soro de albumina bovina (BSA) a 2% (Invitrogen)

diluídas em PBS por 4 horas em temperatura ambiente. Após bloqueio, foram incubadas com anticorpo primário (Quadro 1) por 16 horas a 4 °C em câmara úmida.

No dia seguinte, o anticorpo primário foi removido e as células foram lavadas 3 vezes com PBS 1x e bloqueadas novamente com 2% BSA diluído em PBS em temperatura ambiente por 2 horas. Em seguida a este novo bloqueio, os anticorpos secundários Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 555 e Alexa Fluor 647 (Invitrogen), diluídos 1:500 em PBS contendo 2% de BSA, foram adicionados e mantidos durante 1 hora em temperatura ambiente. Novamente, as células foram lavadas 3 vezes com PBS 1x e DAPI (1µg/mL) foi adicionado por 5 minutos em temperatura ambiente. As lâminas foram montadas utilizando ProLong Gold (Invitrogen). A imunoreatividade foi avaliada em microscópio de epifluorescência Eclipse 80i e no programa *NIS Elements* version 3.22 Nikon (Nikon, TYO, Japão).

Quadro 1 – Anticorpos primários utilizados nos experimentos de imunofluorescência

Anticorpo	Hospedeiro	Código	Diluição	Marca
Anti CD73	Camundongo	ab59462	1:200	Abcam
Anti CD105	Camundongo	ab2529	1:200	Abcam
Anti Vimentina	Coelho	3932S	1:50	Cell Signaling
Anti Vimentina	Camundongo	550513	1:200	BD Pharmingen
Anti Distrofina	Coelho	ab15277	1:50	Abcam
Anti Sox-2	Coelho	2748S	1:100	Cell Signaling
Anti Lin 28	Camundongo	5930S	1:400	Cell Signaling
Anti Human Nucleai	Camundongo	ab191181	1:100	Abcam
Anti Nestina	Galinha	ab81755	1:100	Abcam
Anti GFAP	Camundongo	MAB360	1:1000	Millipore
Anti GFAP	Galinha	ab4647	1:1000	Abcam
Anti MAP2	Camundongo	ab11267	1:1000	Abcam
Anti MAP2	Galinha	ab5392	1:1000	Abcam
Anti NG2	Coelho	AB5320	1:100	Millipore
Anti Homer1	Camundongo	160011	1:200	Synaptic Systems
Anti Sinapsina	Coelho	AB1543	1:500	Millipore

Fonte: (Fernandes, I.R., 2014)

4.6.2 Análise da expressão de marcadores gênicos das células SHED, iPSC, NPC e neurônios de pacientes com e sem DMD por qPCR

Para a caracterização molecular, o meio das células foi removido e as células foram lavadas duas vezes com PBS. Após remoção total do PBS, 1mL de Trizol (Invitrogen) foi adicionado, as células foram homogeneizadas nas placas e transferidas para tubos de microcentrifuga onde foi adicionado 0,5mL de clorofórmio (Merck, Darmstadt, Alemanha). Após gentil homogeneização, as células foram centrifugadas a 12000g durante 15 min a 4°C.

Em seguida, a fase incolor obtida após a centrifugação, contendo o RNA, foi cuidadosamente retirada e 0,5mL de álcool isopropílico (Merck) foram adicionados para a precipitação do RNA, sendo este material mantido por 16 horas a -20 °C. Após esse período, o conteúdo foi centrifugado a 12000g durante 10 min a 4 °C e o precipitado incolor obtido foi lavado com etanol 70%, preparado em água DEPC (dietilpirocarbonato - Invitrogen) e novamente centrifugado a 7500g durante 5 min a 4 °C.

Posteriormente, o etanol foi removido e o precipitado secou ao ar livre durante aproximadamente 10 minutos. Após secagem, o RNA foi ressuscitado de acordo com as instruções do fabricante e do tamanho do precipitado formado em água DEPC.

O RNA obtido foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% e corado *SYBR Safe DNA Stain* para visualização da qualidade do RNA. Em paralelo, o RNA foi dosado por espectrofotometria mensurando A260/A280 pelo Nanodrop (Invitrogen) e posteriormente utilizado na síntese do cDNA.

A síntese de cDNA foi realizada utilizando o kit Super Script II (Invitrogen) onde uma solução contendo 2µg de RNA, 10mM de dNTP, oligo dT (0,5µg/µL) e água tratada com DEPC foi preparada e esta mistura foi aquecida durante 65 °C durante 5 minutos. Após este procedimento, as amostras foram colocadas no gelo por 5 min e foram adicionados o tampão da enzima, 25mm de MgCl₂, 0,1M de DTT e 40U/ µL da enzima RNaseOUT (Invitrogen). Esta mistura foi então submetida a uma temperatura de 42 °C durante 2 min. Em seguida, 1 µL da enzima SuperScript II RT (Invitrogen) foi adicionada e a mistura foi incubada a 42 °C durante 50 minutos. A reação foi terminada elevando a temperatura para 70 °C durante 15 min e, posteriormente a mistura foi armazenada a – 20 °C até a sua utilização. No final, ao cDNA foi acrescido 10µL de DEPC, totalizando 30µL.

Após a síntese de cDNA foi realizada a curva relativa padrão utilizando combinações dos RNAs (entre as células SHED e as iPSC e entre as NPC e os neurônios) na qual foram preparadas utilizando 1/3 do volume final de cada amostra, gerando o padrão 1. Após a obtenção do padrão 1, o mesmo foi diluído 1:5 em água Milli-Q estéril, obtendo o padrão 2. Em seguida, o padrão 2 foi diluído 1:5 em água Milli-Q estéril, produzindo o padrão 3. E por fim, o padrão 3 foi diluído 1:5 em água Milli-Q estéril, produzindo o padrão 4. Dessa forma foram preparados 4 padrões, sendo o 1 mais concentrado e o 4 mais diluído.

Os cDNAs obtidos da extração de RNA foram submetidos ao PCR quantitativo usando iQ SYBR Green Supermix (BioRad, CA, USA). A reação da PCR quantitativa foi preparada utilizando 4,5µL do cDNA como preparado acima e 5 µL do mix IQ e 0,5 µL dos oligonucleotídeos (10mM sense e anti-sense). Triplicata de cada amostra foram aplicadas na placa de 96 poços específica no sistema de detecção de qPCR (CFX 95 - BioRad, CA, USA).

A PCR quantitativa foi incubada no CFX95 utilizando os ciclos de 2 minutos, 30 segundo a 95 °C, 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 60 °C e 45 segundos a 72 °C por 50 ciclos. Após o término, a curva de padrão foi analisada a fim de verificar a amplificação dos oligonucleotídeos em questão. O gene controle interno (*housekeeping*) utilizado em todos os experimentos foi o GAPDH.

Todas as análises foram feitas em quantificação absoluta, relativa aos genes controles utilizando a curva padrão. Os oligonucleotídeos utilizados para este experimento foram desenhados utilizando o software Primer3 ou o Banco de Oligonucleotídeos de Universidade de Harvard (*Primer Bank Harvard*). A sequência dos oligonucleotídeos utilizadas neste trabalho está descrita no quadro 2.

Os qPCR foram realizados de forma comparativa entre as células SHED e iPSC (SHED x iPSC) ou entre as NPC e os neurônios (NPC x neurônios).

Os experimentos foram realizados em triplicatas de cada amostra celular e os dados obtidos foram plotados no GraphPad 5 (Prisma, San Diego, USA). As médias e os desvios padrões foram avaliados usando *t test* Mann Whitney (Quadro 3).

Quadro 2 – Genes utilizados no qPCR

GENE	SENSE	ANTI-SENTE
GAPDH	5'TGCACCACCAACTGCTTAGC'3	5'ATGGAAGTGTGGTCATGAG3'
Vimentina	5'GGAAGCCGAAAACACCCTG3'	5'GAGACGCATTGTCAACATCCT3'
CD105	5'TCTGGACCACTGGAGAATAC 3'	5' GAGGCATGAAGTGAGACAAT3'
CD73	5'AAGGACTGATCGAGCCACTC3'	5'GGAAGTGTATCCAACGATTCCCA3'
Dp71	5'CATGAGGGAACAGCTCAAAGGC3'	5'CAGTCTTCGGAGTTTCATGGCA3'
Dp140	5'ACCGAAAGAGGTTTTTGCACACC3'	5'ACTGGCATCTGTTTTTGAGGATTGC3'
Sox 2	5'CTCGTGCAAGTTCTACTCGTCG 3'	5'AGCTCTCGGTCAGGTCCTTT3'
PAX 6	5'TGGGCAGGTATTACGAGACTG 3'	5'ACTCCCGCTTATACTGGGCTA 3'
Nestina	5'CAACAGCGACGGAGGTCTC3'	5'GCCTCTACGCTCTCTTCTTTGA3'
Sox 1	5'TGAGAAAGTTTGGTGTACCCG3'	5'GGACCTGGATTCCATGAGCAC3'
MAP 2	5'CGAAGCGCCAATGGATTCC 3'	5'TGAACTATCCTTGCAGACACCT3'
Homer 1	5'AGAAGCTGCTCGACTAGCAA3'	5'CCCGTTGATACTTTCCGGTGT3'
Sinapsina	5'CGCAGTTTGGTCATTGGGC3'	5'GTCCCCAGTTTCTTATGCAGTC3'

Fonte: (Fernandes, I.R., 2014)

Quadro 3 – Valor das significâncias para análise dos dados do qPCR

Valor p	Carácter	Significado
< 0,0001	****	Extremamente significante
0,0001 a 0,001	***	Extremamente significante
0,001 a 0,01	**	Muito significante
0,01 a 0,05	*	Significante

Fonte: (Fernandes, I.R., 2014)

4.7 ANÁLISE DA PLASTICIDADE SINÁPTICA DAS CÉLULAS NEURONAIS DE PACIENTES COM E SEM DMD POR QPCR

O perfil de expressão de 84 genes relacionados a alteração sináptica durante o aprendizado e memória dos neurônios produzidos a partir de iPSC de pacientes com DMD foi analisado utilizando *Human Synaptic Plasticity RT² Profile PCR Array* (Qiagen, LJ, Holanda). Para tanto, os neurônios foram submetidos a extração de RNA (conforme descrito no item 4.5.2) e submetidos ao protocolo *descrito no kit Human Synaptic Plasticity RT² Profiler PCR Array* (Qiagen). Em seguida, a placa foi incubada no sistema de detecção de qPCR (CFX 95, BioRad) e os dados obtidos foram plotados em planilha da Qiagen específica para esta placa, disponibilizado no próprio site da Qiagen.

Neste experimento foram realizadas triplicatas de cada amostra e os dados obtidos foram plotados no GraphPad 5. As médias e os desvios padrões foram avaliados usando *t test* Mann Whitney (Quadro 3).

4.8 QUANTIFICAÇÃO DE SINAPSES DAS CÉLULAS NEURONAIS DE PACIENTES COM E SEM DMD

Os neurônios produzidos também foram submetidos ao protocolo de imunofluorescência, como descrito anteriormente no item 4.5.1, utilizando anticorpos específicos para marcação de neurônio pré-sináptico (Sinapsina) e pós-sináptico (Homer 1). Estas marcações foram realizadas a fim de quantificar e comparar a quantidade de colocalização da marcação de pré e pós-sináptico, chamadas de *punctas*.

Este experimento foi realizado em triplicatas. Para a análise e quantificação das marcações foram tiradas 10 fotos de cada clone por paciente em microscópio confocal. Após a obtenção da imagem pelo microscópio de confocal, a contagem das *punctas* presentes nos neurônios DMD e controle foi analisada no programa *Image J* (NIH, MA, USA) utilizando o *plugin Puncta Analyzer* versão 1.48. Os dados obtidos

foram plotados no GraphPad 5. As médias e os desvios padrões foram avaliados usando *t test* Mann Whitney (Quadro 3).

4.9 CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL ATRAVÉS DA MEDIÇÃO DAS CONEXÕES NEURONAIS

Para a realização deste protocolo, os neurônios foram produzidos a partir de neuroesferas de acordo com o seguinte protocolo: após atingir a confluência de 80 ou 90%, as NPC foram raspadas da placa de cultura com o auxílio de uma pequena pá (*Cell Scraper*) e semeadas utilizando meio NGF em uma nova sem tratamento prévio. As NPC foram mantidas em agitação constante (90 rpm) em atmosfera úmida a 37 °C contendo 5% de CO₂, gerando as neuroesferas. No dia seguinte, as neuroesferas foram induzidas a diferenciação neuronal, trocando o meio NGF por somente meio NG, ou seja, meio NG sem adição de FGF. Em seguida foi adicionado 10µM de Rock inibidor, por 48 horas. Após esse período, as neuroesferas foram mantidas em meio NG em agitação por 1 ou 2 semanas.

Após esse período, as neuroesferas foram plaqueadas em uma placa de 12 poços com matrizes de microelétrodo de alto rendimento (MEA) pré-tratadas com poli-orntina e laminina (concentração descrita no item 4.3). Após o plaqueamento, as neuroesferas foram paulatinamente liberando neurônios que foram maturando durante o experimento. O meio foi trocado gentilmente a cada 4 dias e a partir da primeira semana foram feitas leituras no Maestro (Axion Biosystems, GA, USA).

Neste experimento foram realizadas triplicatas de cada amostra analisada e os dados obtidos foram plotados no GraphPad 5. As médias e os desvios padrões foram avaliados usando *t test* Mann Whitney (Quadro 3).

Resultados

5 RESULTADOS

Os resultados obtidos neste trabalho foram analisados e se encontram descritos nesta seção de acordo com o tipo celular.

5.1 ANÁLISE DO CULTIVO E CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO DE DENTE DECÍDUO ESFOLIADO (SHED)

Para a realização deste projeto foram selecionados dois pacientes com DMD e dois pacientes sem DMD, sendo os últimos considerados como “pacientes controle” do projeto. Todos os pacientes doaram os dentes decíduos através do “Projeto A Fada do Dente-DMD” e foram nomeados de paciente 1 ou DMD1, paciente 2 ou DMD2 e pacientes sem DMD controle 1 ou WT1 (do inglês *wild type*) e paciente controle 2 ou WT2.

Após o estabelecimento do cultivo, as células foram analisadas quanto à sua morfologia em passagem 2 (P2), sendo que todos os pacientes (DMD1, DMD2, WT1 e WT2) apresentaram morfologia fibroblastóide (Figura 6A), característica de SHED.

As SHED foram congeladas após serem expandidas para produzir um estoque de células a ser usado nos experimentos deste trabalho. Após o descongelamento das células WT1, WT2, DMD1 e DMD2 foi possível observar poucas células mortas no sobrenadante, indicado pelas setas verdes na figura 6B.

5.1.1 Análise da presença da bactéria *Micoplasma* nas células-tronco de dente decíduo esfoliado (SHED)

A investigação da presença de bactérias do gênero *Micoplasma sp* se faz necessária uma vez que, a mucosa oral, local de origem das SHED, consiste em um habitat natural para esse microrganismo. Em adição, além do micoplasma influenciar inibindo o crescimento celular em culturas, a reprogramação e posterior diferenciação

neuronal de células infectadas com essa bactéria é difícil e ineficiente, ocasionando a morte celular durante o processo de diferenciação.

O teste para análise de contaminação por micoplasma das SHED (WT e DMD) foi realizado usando duplicatas experimentais em momentos diferentes através da técnica de PCR utilizando oligonucleotídeos que contém homologia com várias espécies de micoplasma. As SHED WT1, DMD1 e DMD2 foram negativas para a presença da bactéria, conforme observado pela ausência da banda de DNA correspondente a 460pb (Figura 6C). Na cultura da célula WT2 (Figura 6C) foi detectada a presença da bactéria através da amplificação da banda de DNA de 460pb, correspondendo à contaminação por micoplasma (Figura 6C).

Levando em conta esse resultado, apenas a cultura WT2 foi submetida ao tratamento com o antibiótico plasmocina, sendo o meio trocado a cada 3 ou 4 dias para que não houvesse a perda do potencial farmacológico do antibiótico. Em tempo, durante o processo de tratamento, foram feitos testes através da mesma técnica de PCR para investigar o momento exato em que as células estavam livres da contaminação. Estes testes foram realizados após 6, 10 e 16 dias de tratamento com a plasmocina e demonstraram que apenas no 16º dia houve a remissão completa da contaminação e não havendo visualização da banda de DNA de 460 pb, Convém ressaltar que controles negativos e positivos, bem como água, foram utilizados como controles da PCR (Figura 6D). Após a confirmação da ausência de contaminação das células com o micoplasma, foi iniciada a próxima etapa do projeto, a reprogramação celular.

Figura 6 – Caracterização morfológica e teste de micoplasma nas SHED de pacientes com e sem DMD

Fonte: Fernandes, I. R. (2014)

Legenda: As SHED de pacientes DMD e WT foram cultivadas e caracterizadas. A) Fotomicrografia da cultura das SHED DMD1, DMD2, WT1 e WT2 em passagem P3, apresentando morfologia fibroblastóide. B) Fotomicrografia após criopreservação durante 45 dias das SHED dos pacientes DMD1, DMD2, WT1 e WT2 em nitrogênio. As SHED DMD e WT foram descongeladas e poucas células mortas no sobrenadante das células (seta verde) foram observadas, indicando que estas células podem ser armazenadas no líquido de criopreservação em tanques de nitrogênio. C) Análise por PCR da presença de micoplasma na cultura das células DMD1, DMD2, WT1 e WT2. O cDNA obtido a partir do RNA foi utilizado como fita molde para PCR. Oligonucleotídeos utilizados anelam nos genes do micoplasma. O produto obtido na PCR foi submetido à corrida eletroforética em gel de agarose 1,5%, sob tensão de 100V/cm² e corados com SYBR SAFE DNA STAIN antes de ser fotografado pelo sistema Image Quant VDS. Foi utilizado marcador de peso molecular DNA *ladder* de 100 pb. Observa-se que apenas as células do paciente WT2 foram positivas exibindo uma banda de aproximadamente 460 pb. D) Análise por PCR após tratamento da SHED WT2 com Plasmocina. A presença do micoplasma foi observada durante o tratamento com Plasmocina com 6 e 10 de tratamento. Após 16 dias de tratamento, a célula WT2 foi negativa para o micoplasma não exibindo a banda de 460 bp, indicando remissão da contaminação. A, B) Barra 1000μm.

5.1.2 Análise do fenótipo celular das células-tronco de dente decíduo esfoliado (SHED)

O fenótipo celular das SHED foi analisado através da técnica de imunofluorescência usando anticorpos para verificar a expressão das proteínas: vimentina (proteína de citoesqueleto comumente expressas em células-tronco mesenquimais, CTM), CD73 (enzima ligada à membrana celular presente em CTM) e CD105 (glicoproteína de membrana, presente em CTM). Além disso, também foi analisada a expressão da distrofina, proteína fundamental na DMD.

A figura 7 representa os resultados de triplas marcações utilizando uma combinação das proteínas citadas acima com os anticorpos secundários bem como a última imagem destas análises representa a sobreposição (*merge*). Os resultados obtidos nesta figura são representativo para 1 paciente e 1 controle, mas os mesmos experimentos foram realizados com as células de todos os pacientes e resultados semelhantes foram observados.

Foi possível observar a expressão de vimentina, CD73, CD105 e distrofina tanto nas células SHED controle quanto dos pacientes DMD (Figura 7). Na figura 7A é possível verificar a presença da vimentina em todo o citoesqueleto (vermelho) em ambas às células (WT e DMD) bem como, a expressão de CD73 (verde). A sobreposição das imagens nesta figura deixa em evidência a marcação da vimentina e do CD73 no citoesqueleto quando comparadas com o núcleo corado com DAPI (azul). Interessante notar que a vimentina aparentemente não foi expressa em toda a extensão do citoplasma das SHED DMD. Na figura 7B é possível verificar a presença da vimentina e do CD105 tanto para as SHED DMD quanto WT, sendo que o CD105 foi marcado de forma difusa nas SHED DMD. Esse mesmo perfil de expressão pode ser notado também no *merge* desta imagem. Na figura 7C é possível verificar a expressão da distrofina e vimentina, sendo que a distrofina teve marcação perinuclear nas células WT e DMD, notando-se ainda que nas SHED DMD a marcação da distrofina foi mais difusa e menos intensa quanto comparada com o WT (Figura 7C).

Figura 7- Caracterização por imunofluorescência das SHED de pacientes com e sem DMD

Fonte: Fernandes, I. R. (2014)

Legenda: Análise da expressão de marcadores de células-tronco mesenquimais e da distrofina por ensaios de imunofluorescência utilizando anticorpos específicos nas SHED (WT e DMD). A) Análise do perfil de expressão de vimentina (vermelho) e CD73 (verde), na qual foram imunopositivos para SHED DMD e WT. B) Análise do perfil de expressão de CD105 (verde) em sobreposição com a vimentina (vermelho) onde também foi possível observar a expressão destes dois marcadores em todas as células. C) Análise do perfil de expressão de distrofina (vermelho), vimentina (verde), tanto as células DMD quanto as WT expressaram distrofina aparentemente localizadas na região perinuclear, porém é possível observar que as células DMD apresentam marcação difusa da distrofina quando comparado com os pacientes WT. Em todos os casos o DAPI foi utilizado como corante de núcleo (azul) e a sobreposição foi realizada (merge). Barra: 100 micras (μm).

5.2 GERAÇÃO E SELEÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO PLURIPOTENTES INDUZIDAS (IPSC) A PARTIR DAS CÉLULAS-TRONCO DE DENTE DECÍDUO ESFOLIADO (SHED)

As SHED de paciente com e sem DMD na quarta passagem (P4) foram reprogramadas após a transdução com o vírus Sendai carregando os genes responsáveis pela reprogramação, conhecidos como “os quatro fatores de Yamanaka” (Oct4, Sox2, c-Myc e Klf4), estimulando as células a manifestarem características de células pluripotentes embrionárias.

Após gerar as células-tronco pluripotentes induzidas (iPSC) a partir de SHED de pacientes com e sem DMD, foram selecionados manualmente clones de colônias isoladas e que apresentavam aspecto morfológico de células embrionárias humanas, ou seja, células arredondadas com pouco citoplasma e núcleo grande, formando colônias planas e com a borda bem delimitada.

Dentre os 10 clones isolados de cada linhagem celular, apenas 2 de cada paciente foram selecionados para este projeto de pesquisa, nomeados de iDMD (iPSC dos pacientes DMD) e iWT (iPSC dos pacientes controles WT), conforme descritos na quadro 4.

Quadro 4 – Clones gerados a partir das iPSC denominados de iWT1, iWT2 e pacientes DMD, denominados de iDMD1 iDMD2, dois clones de cada linhagem de células foram gerados e amplificados para a realização dos experimentos.

Células	iWT1	iWT2	iDMD1	iDMD2
Clones	1 e 2	1 e 5	1 e 3	1 e 4

Fonte: (Fernandes, I.R., 2015)

A Figura 8A representa as características morfológicas utilizadas para a seleção dos clones isolados, ou seja, características similares a de células embrionárias humanas mencionadas anteriormente.

5.2.1 Análise do fenótipo celular das iPSC

As iPSC foram analisadas por imunofluorescência quanto a expressão dos marcadores característicos de pluripotência, Sox2 (fator de transcrição) e Lin28 (proteína ligante ao RNA), sendo que Sox2 é expresso no núcleo e o Lin28 é expresso no citoplasma. Foi possível observar colônias positivas para estes dois marcadores nas células iWT e iDMD, sugerindo que as células SHED DMD e WT foram reprogramadas (Figura 8B).

A expressão da distrofina também foi verificada nas células iWT e iDMD e foi possível observar a localização da proteína no núcleo das células (Figura 8C), sendo porém a expressão nas células iDMD foi um pouco mais difusa e de intensidade menor quando comparada as células iWT. A expressão do Lin28 também foi difusa ao comparar com as iWT, podendo sugerir que essa alteração possa estar associada com o papel estrutural da distrofina nas células.

Figura 8 - Fotomicrografia dos aspectos fenotípicos das colônias de iPSC geradas a partir de SHED

Fonte: Fernandes, I. R. (2014)

Legenda: As SHED foram reprogramadas utilizando vírus Sendai e analisadas quanto a morfologia e expressão de marcadores celulares por imunofluorescência. A) Fotomicrografia das células iWT1, iWT2, iDMD1 e iDMD2. Para cada célula, foram isolados 2 clones. Todas as colônias apresentaram morfologia arredondada com núcleo grande e borda delimitada características de células pluripotentes. B) Análise do perfil de expressão de marcadores de pluripotência (Sox2 – vermelho; Lin28 - verde), onde foi possível observar nas células iWT e iDMD a presença dos dois marcadores. C) Análise do perfil de expressão de distrofina (vermelho) nas iDMD e iWT. A dupla marcação nos permite observar uma expressão difusa tanto na distrofina como no Lin28 em ambas células. A) Barra: 1000 µm, B-C) Barra: 100 µm.

5.2.2 Análise da expressão gênica de iPSC

As iPSC, também foram analisadas quanto a expressão relativa de genes específicos para células-tronco mesequimais (vimentina, CD73 e CD105) e para células pluripotentes (Sox2, c-Myc), usando as SHED para comparação, uma vez que as iPSC foram geradas a partir delas. Além destes marcadores, as isoformas da distrofina Dp71 e Dp140 igualmente foram avaliadas.

Houve uma maior expressão dos genes de vimentina, CD73 e CD105 nas SHED quando comparados com as iPSC. Além disso, foi possível verificar que as células WT tiveram maior expressão de todos os três genes quando comparados aos pacientes DMD, sendo a variação do valor de p de 0.001 a 0.01 para vimentina e 0.0001 para CD105 e de 0.001 para o CD73 (Figura 9).

Quanto ao gene Sox2, houve um aumento significativo da expressão nas iPSC quando comparadas com SHED (Figura 9), sendo ainda possível observar uma maior expressão nas iDMD (variação de p entre 0.01 a 0.05). Em relação ao c-Myc foi observada uma expressão prévia à reprogramação nas células SHED, onde houve uma maior expressão nas células WT quando comparadas a DMD (p variando entre 0.0001 a 0.01). Entretanto, a expressão de c-Myc das células controle foi mantida na mesma intensidade após a reprogramação, enquanto que as SHED DMD aumentaram a expressão de c-Myc após a reprogramação celular (p variando 0,001 a 0,01, *), como observado na figura 9. As significâncias de expressão dos genes analisados obtidas entre SHED e iPSC variaram de 0.0001 a 0.001 (Quadro 3).

Em relação a expressão das duas isoformas da distrofina, as Dp71 e Dp140 tiveram suas expressões aumentadas após a reprogramação tanto nas células WT quanto DMD (Figura 9). Houve diferença significativa (0.0001 a 0.001) na expressão entre as células SHED e iPSC tanto para a Dp71 quanto a Dp140, mostrando que estas duas isoformas da distrofina estão mais presentes nas iPSC que nas SHED. Em tempo, em relação a Dp71, apesar da iWT expressar um pouco mais, não foi significativo, ao contrário do resultado obtido para a Dp140 onde a expressão nas iWT muito significante (variando entre 0,0001 a 0,001) em relação as iDMD.

Figura 9: Expressão relativa de genes específicos para células-tronco mesenquimais e células pluripotentes das SHED e iPSC dos pacientes com e sem DMD

Fonte: Fernandes, I. R. (2014)

Legenda: Análise comparativa da expressão relativa (*gene/housekeeping*) de genes de vimentina, CD73, CD105, Sox2, c-Myc, Dp71 e Dp140 entre as células SHED WT, SHED DMD, iWT e iDMD através do qPCR. Vimentina, CD73 e CD105 foram mais expressos nas células SHED. Já, as células iPSC apresentaram baixa expressão destes genes. Houve aumento da expressão do marcador de pluripotência, Sox2 nas células iPSC. O c-Myc foi expresso nas células SHED, entretanto um aumento significativo deste gene foi observado nas células dos pacientes DMD após reprogramação. Houve diferenças na expressão da Dp71 e Dp140 entre as SHED e iPSC, sendo maior nas iPSC. Houve diferença significativa entre iWT e iDMD, para a Dp140.

5.3 PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS PROGENITORAS NEURONAIS (NPC)

As iPSC obtidas foram amplificadas e utilizadas na produção de corpos embrióides (EB). Após aproximadamente 1 semana, os EB estavam maduros e foram gentilmente dissociados e plaqueados sobre uma matriz celular (Matrigel) para iniciar o processo de formação de rosetas neurais, estruturas que contém os progenitores neurais. Após 2 ou 3 dias de cultivo já era possível observar algumas rosetas. Entretanto somente após 7 dias de cultivo é que as rosetas foram coletadas e gentilmente dissociadas para gerar as células progenitoras neurais (NPC), células que posteriormente darão origem aos neurônios. As NPC obtidas apresentavam morfologia estrelar e normalmente ficavam associadas em grupos, como observado na figura 10A.

As NPCs também foram utilizadas nos ensaios de cariotipagem por banda G para verificar se as células submetidas a todos estes procedimentos *in vitro* (reprogramação e diferenciações) tiveram seu cariótipo alterado. Todas as células e seus clones foram submetidos a este ensaio e nenhuma alteração no cariótipo foi observada. Na figura 10B é possível observar que tanto o paciente WT quanto DMD apresentam 46 cromossomos e são masculinos, pois apresentam o par de cromossomos sexuais XY (46,XY).

5.3.1 Análise do fenótipo celular das NPC

As NPC foram caracterizadas fenotipicamente através da técnica de imunofluorescência usando anticorpos que reconhecem Nestina, GFAP, Sox2, MAP2, NG2. Nestina é uma proteína de filamento intermediário comumente expressa em NPC; o GFAP é um marcador de citoesqueleto de células da glia; Sox2 é um fator de transcrição presente no núcleo de células-tronco e progenitoras; MAP2 é marcador de microtúbulo de células neuronais e o NG2 é um marcador de citoesqueleto de células progenitoras de oligodentrócitos. Além destes marcadores a expressão de distrofina também foi avaliada. . Tanto as NPC derivadas de pacientes DMD quanto as células

derivadas dos pacientes sem DMD (WT) expressaram todos os marcadores testados da mesma forma, sem diferença aparente. A marcação foi positiva para Nestina (citoesqueleto) e Sox2 (nuclear) e, negativa para GFAP (Figura 10C). Houve também uma fraca marcação de MAP2 com poucas células expressando essa proteína, que é característica de neurônios diferenciados (Figura 10D e E) e negativas para o marcador de oligodendrocitos NG2 (figura 10 D).

Figura 10 – Caracterização fenotípica das células progenitoras neurais (NPC)

Fonte: Fernandes, I. R. (2014)

Legenda: A) Análise morfológica das NPC em cultivo em passagem 2 (P2). B) Cariótipo por bandagem G das NPC. C) Análise do fenótipo celular para a expressão de Nestina (branco), GFAP (verde) e Sox2 (vermelho). Ambas NPC, WT e DMD foram positivas para Nestina e Sox2 e negativas para GFAP. D) Análise do fenótipo celular para a expressão de Nestina (branco), MAP2 (verde) e NG (vermelho). As NPC foram imunopositivas para Nestina e expressaram MAP2 em poucas células e negativas para NG. E) Análise do fenótipo celular para a expressão de Nestina (branco), MAP2 (verde) e Distrofina (vermelho). As NPC foram positivas para Nestina e tiveram fraca marcação para MAP2. Foi observada uma marcação nuclear difusa da distrofina nas NPC dos pacientes DMD, entretanto, houve aparentemente uma maior expressão da distrofina nos paciente sem DMD. C-E) Barra: 100 µm.

5.4 PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS NEURÔNIOS DE PACIENTES COM E SEM DMD OBTIDOS A PARTIR DA REPROGRAMAÇÃO CELULAR DAS SHED

As células NPC foram submetidas a diferenciação neuronal durante 4 semanas em cultivo celular, produzindo uma cultura mista de neurônios da quinta camada cortical. Somente neurônios mantidos em diferenciação por 4 semanas em cultivo celular foram utilizados neste trabalho.

Na figura 11A é possível observar a morfologia dos neurônios produzidos em cultura após 4 semanas de protocolo de diferenciação. Todos os neurônios apresentaram grandes prolongamentos e pequeno corpo celular, porém aparentemente não foi possível identificar diferenças morfológica entre os pacientes com e sem DMD (WT).

Após a diferenciação, as células neuronais foram caracterizadas por imunofluorescência para MAP2 e GFAP. Tanto os neurônios WT quanto os DMD apresentaram marcação positiva para MAP2 e GFAP (Figura 11B). A marcação para MAP2 e GFAP na mesma cultura é esperada, uma vez que a cultura diferenciada produz neurônios e células da glia, pois se trata de uma cultura mista. Apesar de ser inicialmente usada a mesma quantidade de NPC, foi observada uma maior quantidade de neurônios diferenciados e marcados por MAP2 nos WT quando comparados com pacientes DMD, o que dá uma impressão aparente de maior marcação para MAP2. Ao mesmo tempo, o inverso foi observado para GFAP, sendo maior o número de células marcadas para GFAP para os pacientes com DMD.

Em relação à distrofina foi possível observar sua expressão somente nas células da glia (GFAP positivas), visto especialmente na sobreposição da marcação do GFAP e distrofina na figura 11B e não nos neurônios (MAP2 positivos).

Além de verificar o fenótipo da cultura após diferenciação neuronal usando a técnica de imunofluorescência, o RNA dos neurônios foi extraído, o cDNA foi sintetizado e utilizado como fita molde para a verificar a expressão gênica relativa de alguns genes como PAX6, nestina e Sox2, por qPCR. O PAX 6 é um fator de transcrição presente durante o desenvolvimento embrionário e a nestina e o Sox2 já foram descritos anteriormente nesta seção. A expressão desses genes nos neurônios foi comparada com a expressão dos mesmos nas NPC, pois foram as células que deram de origem aos neurônios.

Na figura 11C foi possível observar maior expressão do gene PAX 6 (p variando entre 0.001 a 0.01) em NPC WT quando comparada à NPC DMD, sendo que esta última não variou a expressão deste gene após diferenciação neuronal, oposto ao ocorrido com o WT, que diminui a expressão de PAX6 após a diferenciação. A expressão de nestina praticamente não variou em relação as células antes e depois da diferenciação neuronal, mas sim foi sempre mais alta nos WT em relação aos pacientes com DMD. Já o gene Sox2 teve sua expressão diminuída após a diferenciação neuronal (p variando entre 0.0001 a 0.001). A comparação dos resultados da expressão relativa desses genes entre NPC e neurônios sugere que houve diferenciação neuronal.

Em tempo, também foi observada a expressão das isoformas da distrofina, Dp 71 e Dp140 por qPCR. A Dp71 foi mais expressa nas NPC DMD e diminuiu sua expressão após a diferenciação em neurônio (neurônio DMD), sendo que o contrário ocorreu com as NPC WT, que aumentaram a expressão de Dp71 após a diferenciação neuronal. Interessante notar também que as NPC DMD expressavam mais DP71 que as NPC WT (p variando entre 0.001 a 0.01) e o inverso foi verdadeiro para os neurônios, onde os neurônios WT expressavam mais a Dp71 (p variando entre 0.001 a 0.01), sugerindo que a Dp71 também pode estar alterada nos neurônios (Figura 11C). Em tempo, assim como a falta de Dp71 no SNC pode levar ao prejuízo na cognição, a falta da Dp140 também está associada ao déficit cognitivo. Para a Dp140, foi observada uma baixa expressão nas NPC e houve aumento da expressão tanto para pacientes com DMD quanto para o WT após a diferenciação neuronal (p variando entre 0.0001 a 0.001), sendo a expressão em neurônios WT maior (Figura 11C).

Figura 11: Diferenciação neuronal a partir das NPC WT e NPC DMD e caracterização celular.

Fonte: Fernandes, I. R. (2014)

Legenda: A) Fotomicrografia dos neurônios após 4 semanas de diferenciação (WT e DMD). B) As células neuronais apresentaram marcação para MAP2 (verde), e para GFAP (branco) e aparentemente há menos neurônios DMD quando comparados com os neurônios WT. Houve marcação para a distrofina nos astrócitos, onde foi possível observar uma sobreposição com o marcador específico de células da glia, GFAP positivo. C) Os genes PAX6, vimentina, Sox 2, Dp71 e Dp140 foram comparados pela expressão relativa de genes (gene/housekeeping) de entre NPC e neurônios através do qPCR. As NPC expressam mais PAX6 e Sox2 que os neurônios. As NPC e neurônios mantiveram o mesmo padrão de Nestina. A Dp71 teve maior expressão nos pacientes NPC DMD, já nas células neuronais, a apresentou maior expressão nos neurônios WT. Nas NPC o mesmo padrão de expressão baixa foi observada para WT e DMD. A Dp140 foi observada maior expressão nos neurônios WT do que os pacientes DMD. Houve muita significância entre a expressão relativa da Dp140 entre as NPC e os neurônios. B-C) Barra: 100 μ m.

5.4.1. Caracterização das sinapses nos neurônios modelados *in vitro*

A distrofina é descrita como uma proteína que atua tanto nas densidades pré quanto nas pós-sinápticas. A fim de verificar e quantificar a colocalização entre os botões sinápticos pré e pós (*puncta* sináptica), foram usadas as proteínas envolvidas nas terminações pré (Sinapsina) e pós-sinápticas (Homer 1) através de ensaio de imunofluorescência. Na figura 12A é possível observar a *puncta* sináptica pela seta amarela da proteína pré (sinapsina - verde) e pós-sináptica (Homer 1 - vermelho). As *punctas* foram contadas com a ajuda do software específico e dos dados foram plotadas em gráfico, sendo que os neurônios WT apresentam mais *punctas* do que neurônios DMD (p variando entre 0.01 a 0.05), como observado na figura 12B. Isto sugere que neurônios DMD apresentam menos sinapses do que WT.

Ainda, analisamos separadamente a expressão dos genes da Sinapsina e Homer1 por qPCR (Figura 12C) onde foi possível observar que os neurônios WT e DMD apresentaram alta expressão de Sinapsina, quando comparados com as NPC. A baixa expressão de Sinapsina pode ser explicada devido ao fato deste gene ser expresso somente em neurônios maduros. No Homer 1 a expressão foi maior nos neurônios do que nas NPC para os WT, enquanto não se alterou muito nas NPC e neurônios DMD. Houve ainda uma diferença na expressão de Homer 1 entre os neurônios WT e DMD, onde os neurônios WT expressaram mais Homer 1 do que os neurônios DMD.

Figura 12: Análise da colocalização entre marcadores pré e pós sináptico dos neurônios WT e DMD

Fonte: Fernandes, I. R. (2014)

Legenda: As células neuronais foram quantificadas quanto sua plasticidade sináptica. A) Análise da expressão do perfil de marcadores de neurônios pré (Sinapsina - verde) e pós-sináptico (Homer 1 - vermelho) de pacientes WT e DMD através de ensaio de imunofluorescência. As setas em amarelo indicam os pontos de colocalização (*punctas* sinápticas) entre Sinapsina e Homer 1. As punctas destes marcadores nos neurônios WT e DMD foram contadas e analisados graficamente. B) Quantificação das punctas (setas amarelas) entre marcadores pré (Sinapsina - verde) e pós-sinápticos (Homer1-vermelho). Os neurônios WT apresentaram diferença significativa de punctas entre marcadores pré e pós-sinápticos, mostrando uma possível diminuição na sinapse nos DMD. C) Análise comparativa da expressão relativa de genes (gene/housekeeping) Sinapsina (pré-sináptico) e Homer 1 (pós-sináptico) entre as células NPC WT e DMD e entre neurônios WT e DMD por qPCR. Os neurônios WT e DMD apresentaram alta expressão de Sinapsina, quando comparados com suas células precursoras, provavelmente porque a sinapsina é um gene expresso somente em células neuronais. Em relação a expressão do Homer 1, houve maior expressão nos neurônios que nas NPC nos WT. Além disso, houve uma diferença na expressão de Homer 1 entre os neurônios WT e DMD, sendo maior nos WT mostrando uma possível alteração na expressão gênica nas densidades pós-sinápticas.

Logo, a fim de verificar se a plasticidade sináptica das células neuronais dos pacientes DMD pode ser alterada devido a deficiência da distrofina, foram analisadas a expressão de genes relacionados a plasticidade sináptica e que contribuem para a sua regulação utilizando uma placa específica contendo os oligonucleotídeos para estes genes. Este ensaio foi realizado para melhor investigar o papel da distrofina nos neurônios, uma vez que a distrofina não possui apenas papel na musculatura, mas exibe papéis importantes no SNC, além de ser associada com o déficit cognitivo em pacientes DMD.

Os dados de expressão gênica obtidos através da qPCR foram plotados em planilha específica do fabricante da placa e um gráfico foi produzido (Figura 13A). Neste gráfico é possível observar que houve expressão elevada e baixa de alguns genes. Na figura 13B estão representados os genes que foram expressos com maior significância e suas respectivas funções de acordo com a literatura. Na figura 13C os genes estão representados e agrupados de acordo com sua função.

Os genes altamente expressos encontrados foram: PRKG1, RHEB, EGR4 e NTF4, já os genes com baixa expressão foram AKT1, DLG4, CDH2, PPP1CA e RAB3A (Figura 13B). O gene DLG4 também conhecido como PSD95 ou proteína pós-sináptica, importante na regulação da plasticidade sináptica, encontra-se fracamente expresso em paciente DMD. A mesma diminuição foi encontrado quando analisamos anteriormente o gene Homer1 (Figura 12A e C).

Com o objetivo de analisar a função dos genes de maior significância, a tabela da figura 13C mostra os genes alterados separados quanto à sua função na plasticidade sináptica, CREB cofatores, moléculas de adesão, genes de resposta imediata, potencialização de longa duração, depressão de longa duração e densidades pós-sinápticas. Os cofatores CREB são proteínas ligantes ao AMPc (ativação do monofosfato de adenosina cíclica) que contribui para aumentar formação de sinapses; moléculas de adesão contribuem nas remodelação após a sinapse; genes de resposta imediata contribuem para o crescimento de novos sítios sinápticos; potencialização de longa duração aumenta a eficácia das transmissões sinápticas; depressão de longa duração leva ao enfraquecimento das terminações sinápticas e densidades pós-sinápticas contém receptores pós-sinápticos responsáveis por captar a informação gerada pela sinapse. Observamos que os genes associados a resposta imediata, potenciação de longa duração e depressão de longa duração estavam mais

alterados nos neurônios de pacientes DMD apresentaram tanto altamente quanto fracamente expressos.

Figura 13: Análise da expressão dos genes associados a plasticidade sináptica entre neurônios WT e DMD

Fonte: Fernandes, I. R. (2014)

Legenda: Análise do perfil de expressão da plasticidade sináptica por qPCR utilizando placa da Qiagen. A) Gráfico representando genes alterados comparando neurônios WT com neurônios DMD. Este gráfico foi gerado pela planilha da Qiagen em seu próprio site. B) Foram encontrados 10 genes alterados dos neurônios DMD em relação ao neurônios WT, dos quais a expressão foi alta: PRKG1, RHEB, EGR4, NTF4 e expressão baixa: AKT1, DLG4, CDH2, PPP1CA, NTF4. C) Os genes alterados foram separados quanto sua função: CREB cofatores, moléculas de adesão celular, genes de resposta imediata, Potenciação de longa duração, depressão de longa duração e densidades pós-sinápticas. Entre eles, observamos que os genes de resposta imediata, potenciação de longa duração e depressão de longa duração, tiveram mais genes alterados.

Os neurônios também foram avaliados funcionalmente através da análise das conexões espontâneas produzidas utilizando placas contendo matrizes de multieletródos extracelulares, no qual foram gravados a transmissão de impulsos espontâneos dos neurônios. Os dados foram gerados de acordo com análises dos picos de atividade neuronal (*spikes*) por segundo.

Os dados foram gerados através da análise no Maestro e os neurônios onde são gerados picos de atividade neuronal produzem uma cor (vermelho, local do *Spike*) que é captada e vai mudando até chegar na cor azul de acordo com a transmissão da excitação espontânea (Figura 14A). Após a análise por cor, os dados gerados foram convertidos em números. Na figura 14B estão os dados gerados após a leitura pelos neurônios WT e DMD. De acordo a leitura feita utilizando este método, aparentemente, ambos os pacientes (WT e DMD) apresentaram o mesmo desempenho, mostrando que os neurônios apresentavam conexões neuronais e, portanto, podem ser considerados neurônios funcionais (Figura 14B).

Figura 14 - Análise das medições das conexões neuronais produzidas pelos dos neurônios *in vitro* de pacientes com e sem DMD

Fonte: Fernandes, I. R. (2014)

Legenda: Os neurônios gerados *in vitro*, foram analisados quanto a excitação espontânea observados pelos os *Spikes* (picos) gravados por segundo. A) Os dados foram gerados através da análise no Maestro, no qual neurônios excitados geram pico de cor (vermelho, local do *Spike*) observando a transmissão da excitação espontânea até chegar na cor azul. B) Após a análise por cor, os dados gerados foram convertidos em números. Tanto o neurônio WT quanto o DMD mostraram mesma atividade espontânea.

Discussão

6 DISCUSSÃO

É sabido que mutações no gene da distrofina levam a problemas na produção da distrofina produzindo uma proteína truncada. A expressão incorreta ou a não expressão desta proteína leva a fraqueza e degeneração da musculatura esquelética, sintomas descritos para a DMD, doença cuja incidência é de 1 a cada 3000 nascimentos de meninos.

Por muitos anos, a distrofina estava sempre relacionada à sua função muscular de sustentação entre os filamentos de actina e a membrana citoplasmática (sarcolema) das células musculares. Porém, a distrofina não está somente presente nas células musculares e, suas funções estão ligadas a sua localização, podendo ser encontradas nas células da retina, fígado, coração, cérebro entre outros. Os estudos realizados para entender o papel da distrofina no SNC foram feitos utilizando cérebro *pós-mortem* (DUBOWITZ; CROME, 1969) ou em modelos animais, como o camundongo *mdx*, utilizados na maioria dos estudos (DOUD et al., 2009; MIRANDA et al., 2011; TADAYONI et al., 2012; GOODNOUGH et al., 2014) que contribuem bastante para o entendimento da doença mas não a mimetiza por completo. O modelo animal mais próximo do humano desta doença são os cachorros GRMD (*Golden Retriever Muscular Dystrophy*) (AMBRÓSIO et al., 2009). Entretanto, ainda não existe na literatura trabalhos demonstrando a expressão da distrofina no cérebro destes animais.

Neste trabalho modelamos a DMD *in vitro* e conseguimos produzir iPSC por reprogramação celular a partir de células-tronco de dente decíduo esfoliado (*stem cells from exfoliated deciduous teeth* - SHED) para então geramos neurônios de pacientes com e sem DMD. A geração de neurônios a partir de células iPSC derivadas de SHED obtidas neste projeto permitiu uma nova abordagem de estudo para esta doença, sendo possível estudar neurônios humanos vivos de pacientes distrofia em uma placa no laboratório. Até o momento, apenas um grupo havia produzido neurônios humanos através de iPSC, mas infelizmente não se aprofundaram nem fizeram estudos funcionais (LUO et al., 2014). Outros grupos que produziram iPSC a partir células de pacientes com DMD tinham como objetivo a restauração da distrofina para aplicação terapêutica das células dos pacientes, o que é de extrema valia considerando as características clínicas da doença. Nosso trabalho trouxe uma

proposta diferente, onde pretendemos analisar os neurônios dos pacientes com DMD visando colaborar para o entendimento de aspectos do neurodesenvolvimento da doença e da participação da distrofina neste sistema.

A modelagem neuronal utilizando células-tronco de dente decíduo esfoliativo é bastante prática, uma vez que não é impelido ao paciente nenhum procedimento invasivo e, o dente decíduo normalmente sofre queda espontânea, um contraponto com a coleta de outros tipos celulares. A escolha das SHED como fonte celular para a reprogramação foi feita em função de algumas observações anteriores, como a fácil obtenção e também devido ao fato destas células apresentarem ótimo desempenho após a criopreservação. Estas características inclusive colocam as SHED como fonte ideal de células-tronco, sendo cotadas como fortes e potenciais candidatas para bancos de células-tronco (ARORA; ARORA; MUNSHI, 2010; HUANG et al., 2010), uma vez que as SHED são células com excelente potencial para uso na Medicina Regenerativa e na Engenharia de Tecidos (MA et al., 2012; EVANGELINELLIS et al., 2014). Além das características mencionadas, para este projeto as células SHED ainda apresentam uma vantagem a mais: elas têm a mesma origem embrionária ectodérmica que as células neuronais (DIDILESCU et al., 2013; KAUKUA et al., 2014), células-alvo deste trabalho, o que deve ser considerado levando-se em conta que mesmo após a reprogramação a célula pode manter uma “memória celular” (MARCHETTO et al., 2008). Por fim, nosso grupo foi pioneiro em utilizar células provenientes da polpa de dente para a reprogramação celular (BELTRÃO-BRAGA et al. 2011).

O sucesso da criopreservação destas células foi também observado aqui uma vez que as SHED obtidas foram congeladas após serem expandidas para produzir um estoque de células a ser usado nos experimentos deste trabalho, bem como foram armazenadas para no futuro formar um biorepositório. Após o descongelamento das células WT1, WT2, DMD1 e DMD2 foi possível observar poucas células mortas no sobrenadante sugerindo que o protocolo de criopreservação utilizado foi eficiente e que estas células conseguem ser mantidas em solução de criopreservação sem alteração da morfologia mantendo viabilidade celular após o descongelamento.

Em tempo, em nossos resultados foi identificada uma possível desvantagem na utilização das células-tronco de polpa dentária em relação a outros tipos celulares, a relativamente alta taxa de contaminação natural pela bactéria do gênero micoplasma (*Mycoplasma sp*). O micoplasma intracelular que está comumente presente na flora

normal da mucosa oral, região onde se encontra o dente decíduo esfoliado, o que torna fácil a presença da bactéria na cultura celular inviabilizando muitas vezes o cultivo. Dados comunicados por colegas dentro da área e da literatura alertam que caso a cultura esteja contaminada por micoplasma é preciso tratar as células adequadamente com antibiótico específico (UPHOFF; DENKMANN; DREXLER, 2012) antes do início da reprogramação. Caso contrário, a reprogramação pode ser dificultada e se as células vierem a ser reprogramadas a diferenciação celular posterior ficará prejudicada (SANTOSTEFANO et al., 2015). Por esse motivo, antes da reprogramação, SHED foram analisadas através da técnica de PCR para presença de micoplasma, sendo que apenas uma das linhagens foi positiva. A linhagem contaminada foi tratada com Plasmocina, conforme descrito pelo fabricante, até a completa remissão da infecção e posteriormente utilizadas na reprogramação.

Em seguida, as células SHED foram caracterizadas por imunofluorescência utilizando marcadores para células-tronco mesenquimais (CD73, CD105 e vimentina) cuja positividade foi observada como descrita anteriormente por vários autores (PITTENGER et al., 1999; DOMENICI et al., 2006; YAMAZA et al., 2010; PIVORIUNAS et al., 2010).

Para reprogramar as SHED o vírus Sendai foi utilizado e as células foram reprogramadas com sucesso. A escolha deste vírus foi baseada no fato de não ser integrativo (LIEU et al., 2013) e, assim, minimizar as chances de mutações quando comparado ao retrovírus, como foi usado por Yamanaka e seu grupo nas primeiras reprogramações (TAKAHASHI et al., 2006; TAKAHASHI; YAMANAKA, 2007). A eficácia da reprogramação utilizando os vírus Sendai já foi descrita anteriormente por Chen et al. (2013) e Lieu et al. (2013).

Após a reprogramação celular das células SHED (WT e DMD) ambas as células expressavam os marcadores de pluripotência Sox2 e Lin28 quando analisadas por imunofluorescência. Estes resultados sugerem eficiência na reprogramação. Resultados semelhantes utilizando o vírus Sendai foram observados em iPSC derivadas de pacientes com atrofia muscular espinhal e bulbar vinculada (CORTES et al., 2014).

Quanto a expressão gênica das iPSC comparadas com as SHED, genes expressos em células-tronco mesenquimais como vimentina, CD73, CD105 foram expressos nas células SHED, como esperado, já que as SHED são consideradas mesenquimais (MIURA et al., 2003; DE MIGUEL et al., 2012, RANGANATHAN;

LAKSHMINARAYANAN, 2012). O gene Sox2 foi altamente expresso nas células iPSC, como esperado, uma vez que este gene é um gene de pluripotência o que também caracteriza a eficiência na reprogramação celular. Importante salientar que também foi possível observar uma expressão basal (bem baixa) de Sox2 nas células SHED, fato este também observado por outros grupos que relatam que as células SHED podem expressar marcadores de pluripotência como o Oct4, Nanog e Sox2 (RANGANATHAN; LAKSHMINARAYANAN, 2012). O proto-oncogene c-Myc também teve sua expressão aumentada após reprogramação o que é bastante comum as células iPSC.

Após gerar células pluripotentes induzidas, seguimos com o protocolo de diferenciação e geramos as células progenitoras neuronais (NPC), que são as células-tronco que dão origem à células presentes no cérebro (KIM et al., 2014). As NPC expressaram marcadores específicos de progenitores neurais como Nestina e Sox2 por imunofluorescência (SCHWARTZ et al., 2011; SIEBZEHRUBL et al., 2011; REINHARDT et al., 2013). A partir das NPC, os cariótipos foram checados e todas as células mantiveram o cariótipo original 46,XY, o que permitiu dar continuidade ao processo de obtenção de neurônios, foco principal deste trabalho.

Neurônios de pacientes com DMD a partir de células iPSC foram produzidos recentemente. Os pesquisadores usaram células de fibroblasto provenientes de fetos DMD com 22 semanas de gestação para reprogramação celular, mas infelizmente não realizaram nenhum ensaio funcional (LUO et al., 2014). Comparando o modelo sugerido por esses autores para a obtenção dos neurônios com o nosso, estabelecido neste trabalho, nosso modelo de estudo é muito mais simples, e factível, pois utiliza-se células do dente de leite, que normalmente tem a sua queda espontânea e podem ser obtido dos pacientes com o diagnóstico efetivo da doença. Além disso, no Brasil, a detecção da distrofina não é feita de forma rotineira e muitas vezes as mães não sabem do diagnóstico de distrofia até que seus filhos comecem a desenvolver os sintomas da doença.

Os neurônios de pacientes com e sem DMD foram gerados *in vitro* após 4 semanas de diferenciação das NPC e posteriormente caracterizados por imunofluorescência e qPCR. Além disso, no intuito de investigar aspectos de comunicação neuronal, quantificamos sinapses e analisamos a resposta da rede neuronal a estímulos. Os neurônios expressaram proteínas de neurônios maduros

MAP2. Entretanto, outra proteína que está presente em células da glia, em especial os astrócitos, a GFAP, também marcou células da cultura que passaram por diferenciação neuronal, sem entretanto marcar as mesmas células que foram marcadas por MAP2, identificando claramente uma cultura com dois tipos celulares distintos provenientes do processo de diferenciação neuronal: neurônios e astrócitos. Os astrócitos podem estar presentes nos processos de diferenciação, pois são células necessárias a sobrevivência dos neurônios (MACIKOVA et al., 2009; BI et al., 2011; LUO et al., 2014). Uma observação interessante adveio do fato de que células GFAP positivas colocalizaram a marcação para distrofina, indicando que a distrofina estava presente nos astrócitos. Estes achados corroboram com achados histológicos de que há Dp71 nos astrócitos (DAOUD et al., 2009; WAITE; BROWN; BLAKE, 2012) e reforçam que a tese de que a modelagem usando iPSC *in vitro* é uma plataforma importante para estudar doenças. O envolvimento da distrofina nos astrócitos abre novas perspectivas no estudo da DMD e a participação de astrócitos na biologia de doenças neurodegenerativas e do neurodesenvolvimento vem sido relatadas frequentemente nos últimos anos (MARAGAKIS; ROTHSTEIN, 2006; SEIFERT; SCHILLING; STEINNHAUSER, 2006).

A análise do perfil de expressão gênica dos neurônios confirmou a diminuição da expressão dos genes presentes em células progenitoras neurais, como PAX6 e Sox2 (CHENG et al., 2014). Para nestina, outro marcador de células progenitoras, a expressão diminuiu em neurônios WT e não se alterou nos neurônios DMD. A presença de nestina em cultura de neurônios já foi relacionada a lesão traumática (KAYA et al, 1999) e doenças neurodegenerativas (MIZUNO et al., 2006). Apesar da expressão relativa da nestina ter se apresentado maior em neurônios WT, há uma tendência na diminuição da nestina após a diferenciação neuronal nos pacientes controle, o que é esperado, ao passo que isso não ocorreu para as células DMD. A presença desse marcador sugere que a cultura de neurônios ainda continham células progenitoras (BELKIND-GERSON et al., 2013). A presença de células nestina positivas precisa ser investigada usando também outros ensaios para verificar se esse achado se reproduz.

Além disso, analisamos a expressão gênica relativa de 84 genes relacionados a plasticidade sináptica dos neurônios DMD por qPCR. Dentre todos estes genes analisados, apenas 10 genes se apresentaram alterados em relação aos neurônio WT, relacionados a resposta imediata, potenciação de longa duração, depressão de

longa duração e densidade pós sináptica. A depressão de longa duração nas células de Purkinge já foi observada em estudos realizado com camundongo mdx (ANDERSON; HEAD; MORLEY, 2004; CYRULNIK; HILTON, 2008) sugerindo o déficit cognitivo encontrado em alguns pacientes DMD. Em relação aos genes de densidade pós-sináptica, houve baixa expressão de DLG4. Resultado em concordância com esse foi visto usando outro marcador, o Homer 1, sendo que nos neurônios DMD a expressão relativa para o gene Homer 1 se manteve praticamente inalterada em relação as NPC, quando esta deveria aumentar por estarem as sinapses presentes em neurônios e não em NPC. Em tempo, a Dp71 está localizada na densidade pós-sináptica, colocalizada com PSD95, Vglut e Shank (DAOUD et al., 2009) e a diminuição de marcadores pós sinápticos podem estar associada a esta característica. Ainda, a perda da Dp71 pode afetar na maturação e na função sináptica, podendo levar a déficit na cognição dos pacientes DMD (KIM et al., 1995; ANDERSON et al., 2002; DAOUD et al., 2009). Apesar de sugerirem, nossos dados não afirmam essa correlação direta, pois não analisamos a expressão das isoformas da distrofina em nossos neurônios em concordância com os marcadores pré e pós-sinápticos. Além disso, os ensaios de colocalização de botões pré e pós sinápticos revelaram que os neurônios WT tinham mais *punctas* sinápticas do que os DMD, o que pode representar um funcionamento sináptico pior para os pacientes.

Os neurônios obtidos nesse trabalho apresentaram praticamente a mesma conectividade funcional, mostrando que não havia diferença entre pacientes com e sem DMD, não sendo os neurônios DMD altamente excitáveis como é o caso em algumas doenças. Não há também nenhum estudo até o momento realizado com células de pacientes DMD, muito menos em estudo *in vivo* para compararmos nossos achados. Já neurônios motores gerados *in vitro* de pacientes com Esclerose lateral amiotrófica (ELA) a partir de células iPSC, se mostram mais excitáveis do que os neurônios controle. Esta excitabilidade gerada pelos neurônios motores de pacientes com ELA pode contribuir para a morte dos neurônios motores (WAINGER et al., 2014).

Dentre as várias formas de distrofina, a Dp71 é a mais atraente para este estudo, não por estar presente de forma ubíqua em nosso organismo, mas por ser o produto do gene da distrofina mais abundante no cérebro. Mutações que afetam significativamente a expressão da Dp71 no SNC estão associadas ao déficit cognitivo presente em pacientes DMD. Este déficit vem sendo ocasionado devido a perda da Dp71 nas densidades sinápticas (DAOUD et al., 2009).

As expressões das isoformas da distrofina, Dp71 e Dp140, também foram quantificadas e analisadas por qPCR. Foi possível observar que ambas foram expressas em maior quantidades nas células iWT e iMD do que nas células antes da reprogramação (SHED). Vale a pena ressaltar, que a Dp71 é o primeiro produto de um gene detectável durante o desenvolvimento embrionário e expresso nas células-tronco pluripotentes embrionárias (TADAYONI et al., 2012), fato esse que pode explicar a expressão aumentada destes genes após a reprogramação celular, procedimento no qual as células obtidas são pluripotentes e carregam características de células-tronco embrionárias. Em relação a expressão do gene Dp140, não foi observada expressão nas células SHED, mas somente nas iPSC. Entretanto, diferentemente da Dp71, a Dp140 é expressa somente nas células presentes no SNC (LIVOD et al., 1996; CHAMOVA et al., 2013).

A expressão da Dp71 foi maior nas NPC DMD do que nas NPC WT fato este que pode ter ocorrido como uma forma de mecanismo compensatório da célula para tentar produzir mais proteína Dp71. É sabido Dp71d (isoforma da Dp71) foi relacionado a modulação das células PC12 (linhagem celular feocromocitoma de rato) durante a diferenciação neuronal, sugerindo que ainda esta proteína pode mediar resposta nuclear durante o processo de diferenciação (RODRÍGUES-MUÑOZ et al., 2008; CERNA et al., 2009; VILLARREAL-SILVA et al., 2010; BENABDESSELAM et al., 2012).

Já nos neurônios, a expressão da Dp71 foi maior nos WT sugerindo que pacientes DMD possuem déficit na produção da proteína Dp71 que pode levar a outras alterações cerebrais, como desordem na arquitetura neuronal, déficit cognitivo, entre outros como sugerido em estudos anteriores (ANDERSON et al., 2002).

A expressão da Dp140 também foi verificada nas NPC e neurônios, no qual os neurônios WT tiveram maior expressão. O paciente DMD1 apresenta mutação no gene da distrofina que codifica a isoforma da Dp140 talvez por este motivo, os neurônios dos pacientes DMD tiveram a expressão da Dp140 menor em relação aos WT, porém não houve significância na expressão entre WT e DMD.

Estudo por ressonância magnética com pacientes DMD que não produziam a Dp140 mostrou que os pacientes apresentavam redução da massa branca e cinzenta em todo o nível cerebral, indicando que a Dp140 pode estar relacionada com o desenvolvimento do cérebro (DOORENWEERD et al., 2014) e também pode aumentar o risco de deficiência intelectual (CHAMOVA et al., 2013).

Outros estudos envolvidos na função da distrofina no SNC devem feitos, pois como foi demonstrado aqui, a falta da distrofina no cérebro pode levar a diversas alterações ou ainda pode estar associada à outras doenças neurodegenerativas, como o autismo (MEHLER, 2000; WU et al., 2005; HENDRIKSEN; VLES, 2008; PAGNAMENTA et al., 2011), esquizofrenia (ZATZ et al., 1993; LINDOR et al., 1994; HARRISON; WEINBERGER, 2005), Alzheimer (WILCOCK et al., 2009), e talvez haja outras doenças nas quais a distrofina esteja relacionada e não foram descritas.

Neste trabalho, os neurônios gerados após 4 semanas de diferenciação expressaram MAP2, Sinapsina e Homer 1, marcadores importantes de sinapses neuronais que permitiram estudos de conectividade neuronal. Além disso, com esses neurônios foi possível realizar ensaios funcionais na rede neuronal quantificando conexões espontâneas geradas pelos neurônios *in vitro* e sinapses funcionais, verificando que os pacientes DMD tem menos em relação aos controles. Estudos com neurônios *in vitro* tem sido de grande valia para o estudo de doenças neurodegenerativas como ELA (WAINGER et al., 2014) e doenças do neurodesenvolvimento como autismo (GRIESI-OLIVEIRA et al., 2014) e Síndrome de Rett (MARCHETTO et al., 2010), contribuindo para o entendimento das doenças. Neste trabalho procuramos gerar mais informações sobre o perfil neuronal da DMD, primeiros passos para entender o papel da distrofina no sistema nervoso e suas relações.

O entendimento da função da distrofina não contribuiria somente para encontrar uma cura para a Distrofia Muscular de Duchenne tanto na parte muscular quanto na cognitiva, mas também ajudam a entender e extrapolar melhor o papel dessa proteína e sua relação com DMD e outras doenças neurodegenerativas.

Conclusão

7 CONCLUSÃO

- ✓ Células-tronco de dente decíduo esfoliado (SHED) são eficazes para modelagem neuronal produzindo neurônios maduros e funcionais.
- ✓ Neurônios de pacientes DMD apresentaram alteração na quantificação de sinapses, com menos sinapses comparados aos controle
- ✓ A distrofina tem papel importante na plasticidade sináptica, de acordo com a maior quantidade de sinapses encontradas nos neurônios WT
- ✓ A distrofina está presente no SNC, tanto em neurônios quanto em astrócitos e foi detectada nesses tipos celulares em nosso modelo
- ✓ A distrofina foi encontrada em células gliais em maior quantidade que nos neurônios sugerindo uma possível participação dessa proteína nos astrócitos abrindo novas perspectivas de estudo.

Referências

REFERÊNCIAS

- ALEMÁN, V.; OSORIO, B.; CHAVEZ, O.; RENDON, A.; MORNET, D.; MARTINEZ, D. Subcellular localization of Dp71 dystrophin isoforms in cultured hippocampal neurons and forebrain astrocytes. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 115, n. 3, p. 243-254, 2001.
- AMBRÓSIO, C. E.; FADEL, L.; GAIAD, T. P.; MARTINS, D. S.; ARAÚJO, K. P.; ZUCCONI, E.; BROLIO, M. P.; GIGLIO, R. F.; MORINI, A. C.; JAZEDJE, T.; FROES, T. R.; FEITOSA, M. L.; VALADARES, M. C.; BELTRÃO-BRAGA, P. C.; MEIRELLES, F. V.; MIGLINO, M. A. Identification of three distinguishable phenotypes in golden retriever muscular dystrophy. **Genetics and Molecular Research**, v. 8, n. 2, p. 389-396, 2009.
- ANDERSON, J. L.; HEAD, S. I.; RAE, C.; MORLEY, J. W. Brain function in Duchenne muscular dystrophy. **Brain**, v. 125, p. 4-13, 2002.
- ANDERSON, J. L.; HEAD, S. I.; MORLEY, J. W. Long-term depression is reduced in cerebellar Purkinje cells of dystrophin-deficient mdx mice. **Brain Research**, n. 1019, v. 1-2, p. 289-292, 2004.
- ARORA, V.; ARORA, P.; MUNSHI, A. K. Banking stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED): saving for the future. *The Journal of Clinical Pediatrics Dentistry*, v. 33, n. 4, p. 289-294, 2009.
- BEENAKKER, E. A. C.; DE VRIES, FOCK, J.; 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.
- BELKIND-GERSON, J.; CARREON-RODRIGUEZ, A.; BENEDICT, L. A.; STEIGER, C.; PIERETTI A.; NAGY, N.; DIETRICH, J.; GOLDSTEIN, A. M. Nestin-expressing cells in the gut give rise to enteric neurons and glial cells. **Neurogastroenterology and Motility**, v. 25, n. 1, p. 61-9.e7, 2013.
- BELTRÃO-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. 1707-1719, 2011.
- BELTRÃO-BRAGA, P. C. B.; PIGNATARI, G. C.; MAIORKA, P. C.; OLIVEIRA, N. A. J.; 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.1707-1719, 2011.
- BENABDESSELAM, R.; DORBANI-MAMINE, L.; BENMESSAOUD-MESBAH, O.; RENDON, A.; MHAOUTY-KODJA, S.; HARDIN-POUZET, H. Dp71 gene disruption alters the composition of the dystrophin-associated protein complex and neuronal nitric oxide synthase expression in the hypothalamic supraoptic and paraventricular nuclei. **Journal of Endocrinology**, v. 213, n. 3, p. 239-49, 2012.

Bi, B.; Salmaso, N.; Komitova, M.; Simonini, M. V.; Silbereis, J.; Cheng, E.; Kim, J.; Luft, S.; Ment, L. R.; Horvath, T. L.; Schwartz, M. L.; Vaccarino, F. M. Cortical glial fibrillary acidic protein-positive cells generate neurons after perinatal hypoxic injury. **Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 25, p. 9205-9221, 2011.

BRENNAND, K. J.; SIMONE, A.; JOU, J.; GELBOIN-BURKHART, C.; TRAN, N.; SANGAR, S.; LI, Y.; MU, Y.; CHEN, G.; YU, D.; MCCARTHY, S.; SEBAT, J.; GAGE, F. H. Modelling schizophrenia using human induced pluripotent stem cells. **Nature**, v. 473, n. 7346, p. 221-225, 2011.

CAMNASIO, S.; DELLI CARRI, A.; LOMBARDO, A.; GRAD, I.; MARIOTTI, C.; CASTUCCI, A.; ROZELL, B.; LO RISO, P.; CASTIGLIONI, V.; ZUCCATO, C.; ROCHON, C.; TAKASHIMA, Y.; DIAFERIA, G.; BIUNNO, I.; GELLERA, C.; JACONI, M.; SMITH, A.; HOVATTA, O.; NALDINI, L.; DI DONATO, S.; FEKI, A.; CATTANEO, E. The first reported generation of several induced pluripotent stem cell lines from homozygous and heterozygous Huntington's disease patients demonstrates mutation related enhanced lysosomal activity. **Neurobiology of Disease**, 46(1):41-51, 2012.

CERNA, J.; OSUNA-CASTRO, J. O.; MUNIZ, J.; MORNET, D.; GARCIA-SIERRA, F.; CISNEROS, B. Dystrophin Dp71f associates with components of the $\beta 1$ -integrin adhesion complex in PC12 cell neurites. **Acta Neurol. Belg**, v. 109, p. 132-135, 2009.

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. 11141-56, 1988.

CHAMOVA, T.; GUERGUELTCHEVA, V.; RAYCHEVA, M.; TODOROV, T.; GENOVA, J.; BICHEV, S.; BOJINOVA, V.; MITEV, V.; TOURNEV, I.; TODOROVA, A. Association between loss of dp140 and cognitive impairment in duchenne and becker dystrophies. **Balkan Journal of Medical Genetics**, v. 16, n. 1, p. 21-30, 2013.

CHANG, T.; ZHENG, W.; TSARK, W.; BATES, SE.; HUANG, H.; LIN, R. J.; YEE, J. K. Phenotypic Rescue of Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Motoneurons of a Spinal Muscular Atrophy Patient. **Stem Cells**, 2011.

CHEN, I. P.; FUKUDA, K.; FUSAKI, N.; IIDA, A.; HASEGAWA, M.; LICHTLER, A.; REICHENBERGER, E. J. Induced pluripotent stem cell reprogramming by integration-free Sendai virus vectors from peripheral blood of patients with craniometaphyseal dysplasia. **Cell Reprogramming**, v. 15, n. 6, p. 503-513, 2013.

CONRAD, C.; HUSS, R. Adult stem cell lines in regenerative medicine and reconstructive surgery. **The Journal of Surgical Research**, v. 124, n. 2, p. 201-8, 2005.

CORTES, C. J.; MIRANDA, H. C.; FRANKOWSKI, H.; BATLEVI, Y.; YOUNG, J. E.; LE, A.; IVANOV, N.; SOPHER, B. L.; CARROMEU, C.; MUOTRI, A. R.; GARDEN, G. A.; LA SPADA, A. R. Polyglutamine-expanded androgen receptor interferes with TFEB to elicit autophagy defects in SBM A. **Nature Neuroscience**, n. 17, v. 9, p. 1180-9, 2014.

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

DALLOZ, C.; SARIG, R.; FORT, P.; YAFFE, D.; BORDAIS, A.; PANNICKE, T.; GROSCHE, J.; MORNET, D.; REICHENBACH, A.; SAHEL, J.; NUDEL, U.; RENDON, A. Targeted inactivation of dystrophin gene product Dp71: phenotypic impact in mouse retina. **Human Molecular Genetics**, v. 12, n. 13, p. 1543-54, 2003.

DAOUD, F.; CANDELARIO-MARTÍNEZ, A.; BILLARD, J. M.; AVITAL, A.; KHELFAOUI, 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. e6574, 2009.

DARABI, R.; ARPKE, R. W.; IRION, S.; DIMOS, J. T.; GRSKOVIC, M.; KYBA, M.; PERLINGEIRO, R. C. Human ES- and iPS-derived myogenic progenitors restore DYSTROPHIN and improve contractility upon transplantation in dystrophic mice. **Cell Stem Cell**, v. 10, n. 5, p. 610-9, 2012.

DE MIGUEL, M. P.; FUENTES-JULIÁN, S.; BLÁZQUEZ-MARTÍNEZ, A.; PASCUAL, C. Y.; ALLER, M. A.; ARIAS, J.; ARNALICH-MONTIEL, F. Immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells: advances and applications. **Current Molecular Medicine**, v. 12, n. 5, p. 574-91, 2012.

DIDILESCU, A. C.; RUSU, M. C.; NINI, G. Dental pulp as a stem cell reservoir. **Romania Journal of Morphological Embryo**, v. 54, n. 3, p. 473-8, 2013.

DOMINICI, M.; LE BLANC, K.; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F.; KRAUSE, D. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315-7, 2006.

DOORENWEERD, N.; STRAATHOF, C. S.; DUMAS, E. M.; SPITALI, P.; GINJAAR, I. B.; WOKKE, B. H.; SCHRANS, D. G.; VAN DEN BERGEN, J. C.; VAN ZWET, E. W.; WEBB, A.; VAN BUCHEM, M. A.; VERSCHUUREN, J. J.; HENDRIKSEN, J. G.; NIKS, E. H.; KAN, H. E. Reduced cerebral gray matter and altered white matter in boys with Duchenne muscular dystrophy. **Annals of Neurology**, v. 76, n. 3, p. 403-11, 2014.

DRAVIAM, R.; BILLINGTON, L.; SENCHAK, A.; HOFFMAN, E. P.; WATKINS, S. C. Confocal analysis of the dystrophin protein complex in muscular dystrophy. **Muscle Nerve**, n. 24, v. 2, p. 262-272, 2001.

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

EBERT, A. D.; YU, J.; ROSE JR, F. F.; MATTIS, V. B.; LORSON, C. V.; THOMSON, J. A.; SVENDSEN, C. V. Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. **Nature**, n. 457, p. 277-280, 2009.

EBIHARA, S.; GUIBINGA, G. H.; GILBERT, R.; NALBANTOGLU, J.; MASSIE, B.; KARPATI, G.; PETROF, B. J. Differential effects of dystrophin and utrophin gene transfer in immunocompetent muscular dystrophy (mdx) mice. **Physiological Genomics**, v. 8, n. 3, p. 133-144, 2000.

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

EVANGELINELLIS, M. M.; PIGNATARI, G. C.; BELTRÃO, C. F. B.; BELTRÃO-BRAGA, P. C. B. The Use of SHED in Cellular Therapy and Disease Modeling. **Journal of Interdisciplinary Medical Dental Science**, v.2, n. 5, p. 1-8, 2014.

FELISARI, G.; MARTINELLI-BONESCHI, F.; BARDONI, A.; SIRONI, M.; COMI, G. P.; ROBOTTI, M.; TURCONI, A. C.; LAI, M.; CORRAO, G.; BRESOLIN, N. Loss of Dp140 dystrophin isoform and intellectual impairment in Duchenne dystrophy. **Neurology**, v. 55, n. 4, p. 559-564, 2000.

FERNANDES, I. R.; RUSSO, F. B.; PIGNATARI, G. C.; EVANGELINELLIS, M. M.; TAVOLARI, S.; MUOTRI, A. R.; BELTRÃO-BRAGA, P. C. Fibroblast sources: Where can we get them? **Cytotechnology**, 2014.

FERNANDES, I. R.; RUSSO, F. B.; PIGNATARI, G. C.; EVANGELINELLIS, M. M.; TAVOLARI, S.; MUOTRI, A. R.; BELTRÃO-BRAGA, P. C. Fibroblast sources: Where can we get them? **Cytotechnology**, 2014.

FLETCHER, S.; ADAMS, A. M.; JOHNSON, R. D.; GREER, K.; MOULTON, H. M.; WILTON, S. D. Dystrophin isoform induction in vivo by antisense-mediated alternative splicing. **Molecular Therapy**, v. 18, n. 6, p. 1218-1223, 2010.

FORT, P. E.; SENE, A.; PANNICKE, T.; ROUX, M. J.; FORSTER, V.; MORNET, D.; NUDEL, U.; YAFFE, D.; REICHENBACH, A.; SAHEL, J. A.; RENDON, A. Kir4.1 and AQP4 associate with Dp71- and utrophin-DAPs complexes in specific and defined microdomains of Müller retinal glial cell membrane. **Glia**, v. 56, n. 6, p. 597-610, 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. 237-43, 2005.

GONZÁLEZ-RAMÍREZ R; MORALES-LÁZARO SL; 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. 735-45, 2008.

GOODNOUGH, C. L.; GAO, Y.; LI, X.; QUTASH, M. Q.; GOODNOUGH, L. H.; MOLTER, J.; WILSON, D.; FLASK, C. A.; YU, X. Lack of dystrophin results in abnormal cerebral diffusion and perfusion in vivo. **Neuroimage**, n. 102, v. 2, p. 809-816, 2014.

GRIESI-OLIVEIRA K.; ACAB, A.; GUPTA, A. R.; SUNAGA, D. Y.; CHAILANGKARN, T.; NICOL, X.; NUNEZ, Y.; WALKER, M. F.; MURDOCH, J. D.; SANDERS, S. J.; FERNANDEZ, T. V.; JI, W.; LIFTON, R. P.; VADASZ, E.; DIETRICH, A.; PRADHAN, D.; SONG, H.; MING, G. L.; GU, X.; HADDAD, G.; MARCHETTO, M. C.; SPITZER, N.; PASSOS-BUENO, M. R.; STATE, M. W.; MUOTRI, A. R. Modeling non-syndromic autism and the impact of TRPC6 disruption in human neurons. **Molecular Psychiatry**, 2014.

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**, v. 97, n. 25, p.13625-30, 2000.

GUAN, X.; MACK, D. L.; MORENO, C. M.; STRANDE, J. L.; MATHIEU, J.; SHI, Y.; MARKERT, C. D.; WANG, Z.; LIU, G.; LAWLOR, M. W.; MOOREFIELD, E. C.; JONES, T. N.; FUGATE, J. A.; FURTH, M. E.; MURRY, C. E.; RUOHOLA-BAKER, H.; ZHANG, Y.; SANTANA, L. F.; CHILDERS, M. K. Dystrophin-deficient cardiomyocytes derived from human urine: new biologic reagents for drug discovery. **Stem Cell Research**, v. 12, n. 2, p. 467-80, 2014.

HAENGGI, T.; FRITSCHY, J. M. Role of dystrophin and utrophin for assembly and function of the dystrophin glycoprotein complex in non-muscle tissue. **Cellular and Molecular Life Sciences CMLS**, v. 63, n. 14, p. 1614-1631, 2006.

HENDRIKSEN, J. G. M.; VLES, J. S. H. Are males with Duchenne muscular dystrophy at risk for Reading disabilities? **Pediatric Neurology**, v. 34, p. 296-300, 2006.

HARRISON, P. J.; WEINBERGER, D. R. Schizophrenia genes, gene expression, and neuropathology: on the matter of their convergence. **Molecular Psychiatry**, v. 10, n. 1, p. 40-68, 2005.

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 Practice**, v. 19, p. 146-154, 2004.

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. 339-46, 2009.

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 Nerology**, v. 49, p. 123-128, 2007.

HUANG, G. T.; GRONTHOS, S.; SHI, S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. **Journal of Dental Research**, v. 88, n. 9, p. 792-806, 2009.

HUANG, Y. H.; YANG, J. C.; WANG, C. W.; LEE, S. Y. Dental Stem Cells and Tooth Banking for Regenerative Medicine. **Journal of Experimental Clinical Medical**, v. 2, n. 3, p. 111–117, 2010.

HUARD, J.; TREMBLAY, J. P. Localization of dystrophin in the Purkinje cells of normal mice. **Neuroscience Letters**, v. 137, p. 105–108, 1992.

ILARRAZA-LOMELI, R.; CISNEROS-VEGA, B.; CERVANTES-GOMEZ, M. D. E. L.; MORNET, D.; MONTAÑEZ, C. Dp71, utrophin and beta-dystroglycan expression and distribution in PC12/L6 cell cocultures. **Neuroreport**, v. 18, n. 16, p. 1657-1661, 2007.

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 LE. Brain morphology in Duchenne muscular dystrophy: a Golgi study. **Pediatric Neurology**, v. 4, n. 2, p. 87-92, 1988.

JANG, J.; YOO, J. E.; LEE, J. A.; LEE, D. R.; KIM, J. Y.; HUH, Y. J.; KIM, D. S.; PARK, C. Y.; HWANG, D. Y.; KIM, H. S.; KANG, H. C.; KIM, D. W. Disease-specific induced pluripotent stem cells: a platform for human disease modeling and drug discovery. **Experimental and Molecular Medicine**, v. 44, n. 3, p. 202-213, 2012.

JUNG, D.; FILLIOL, D.; METZ-BOUTIGUE, M. H.; RENDON, A. Characterization and subcellular localization of the dystrophin-protein 71 (Dp71) from brain. **Neuromuscular Disorders**, v. 3, n. 5-6, p. 515-8, 1993.

KARAMZADEH, R.; ESLAMINEJAD, M. B. Dental-Related Stem Cells and Their Potential in Regenerative Medicine. In: ANDRADES, J. A. **Regenerative Medicine and Tissue Engineering**. Croácia, Intech, 2013, p. 953-978.

KAUKUA, N.; SHAHIDI, M. K.; KONSTANTINIDOU, C.; DYACHUK, V.; KAUCKA, M.; FURLAN, A.; AN, Z.; WANG, L.; HULTMAN, I.; AHRlund-RICHTER, L.; BLOM, H.; BRISMAR, H.; LOPES, N. A.; PACHNIS, V.; SUTER, U.; CLEVERS, H.; THESLEFF, I.; SHARPE, P.; ERNFORS, P.; FRIED, K.; ADAMEYKO, I. Glial origin of mesenchymal stem cells in a tooth model system. *Nature*, 2014, v. 513, n. 7519, p. 551-554, 2014.

KAYA, S. S.; ASIM, M.; LI, Y.; YAVUZ, E.; CHOPP, M. Expression of nestin after traumatic brain injury in rat brain. **Brain Research**, v. 840, n. 1–2, p. 153–157, 1999.

KAZUKI, I. H.; ARORA, N.; HUO, H.; MAHERALI, N.; AHFELDT, T.; SHIMAMURA, A.; LENSCH, M. W.; COWAN, C.; HOCHEDLINGER, K.; DALEY, G. Q. Disease-specific induced pluripotent stem cells. **Cell**, v. 134, n. 5, p. 877-886, 2008.

KAZUKI, Y.; HIRATSUKA, M.; TAKIGUCHI, M.; OSAKI, M.; KAJITANI, N.; HOSHIYA, H.; HIRAMATSU, K.; YOSHINO, T.; KAZUKI, K.; ISHIHARA, C.; TAKEHARA, S.; HIGAKI, K.; NAKAGAWA, M.; TAKAHASHI, K.; YAMANAKA, S.; OSHIMURA, M. Complete genetic correction of ips cells from Duchenne muscular dystrophy. **Molecular Therapy**, v. 18, n. 2, p. 386-393, 2010.

KIM, D. S.; ROSS, P. J.; ZASLAVSKY, K.; ELLIS, J. Optimizing neuronal differentiation from induced pluripotent stem cells to model ASD. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, v.8, p.109, 2014.

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.

LA NOCE, M.; MELE, V.; TIRINO, F.; PAINO, A.; DE ROSA, P.; NADDEO, P.; PAPAGERAKIS, G.; PAPACCIO, V.; DESIDERIO, A.; NAPOLI, S. Neural crest stem cell population in craniomaxillofacial development and tissue repair. **European cells & materials**, v. 28, p. 348-357, 2014.

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.

LEDERFEIN, D.; LEVY, Z.; AUGIER, N.; MORNET, D.; MORRIS, G.; FUCHS, O.; YAFFE, D.; NUDEL, U. A 71-kilodalton protein is a major product of the Duchenne muscular dystrophy gene in brain and other nonmuscle tissues. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America**, v. 15, n. 12, p. 5346-5350, 1992.

LEE, J. S.; PFUND, Z.; JUHÁSZ, C.; BEHEN, M. E.; MUZIK, O.; CHUGANI, D. C.; NIGRO, M. A.; CHUGANI, H. T. Altered regional brain glucose metabolism in Duchenne muscular dystrophy: a pet study. **Muscle Nerve**, v. 26, n. 4, p. 506-12, 2002.

LI, H. L.; FUJIMOTO, N.; SASAKAWA, N.; SHIRAI, S.; OHKAME, T.; SAKUMA, T.; TANAKA, NAOKI AMANO, M.; WATANABE, A.; SAKURAI, H.; YAMAMOTO, T.; YAMANAKA, S.; HOTTA, A. Precise Correction of the Dystrophin Gene in Duchenne Muscular Dystrophy Patient Induced Pluripotent Stem Cells by TALEN and CRISPR-Cas9. **Stem Cell Reports**, v.4, n.1, p.143–154, 2015.

LIDOV, H. G. W.; BYERS, T. J.; WATKINS, S. C.; KUNKEL, L. M. Localization of dystrophin to postsynaptic regions of central nervous system cortical neurons. **Nature**, v. 348, p. 725-728, 1990.

LIDOV, H. G. W.; BYERS, T. J.; KUNKEL, L. M. The distribution of dystrophin in the murine central nervous system: an immunocytochemical study. **Neuroscience**, v. 54, p. 167-187, 1993.

LIDOV, H. G. Dystrophin in the nervous system. **Brain Pathology**, v. 6, n. 1, p. 63-77, 1996.

LIEU, P. T.; FONTES, A.; VEMURI, M. C.; MACARTHUR, C. C. Generation of induced pluripotent stem cells with CytoTune, a non-integrating Sendai virus. **Methods in Molecular Biology**, v. 997, p.45-56, 2013.

LUO, Y.; FAN, Y.; CHEN, X.; YUE, L.; YU, B.; LI, Q.; CHEN, T.; SUN, X. Modeling induced pluripotent stem cells from fibroblasts of Duchenne muscular dystrophy patients. **International Journal of Neuroscience**, v. 124, n. 1, p. 12-21, 2014.

MA, L.; MAKINO, Y.; YAMAZA, H.; AKIYAMA, K.; HOSHINO, Y.; SONG, G.; KUKITA, T.; NONAKA, K.; SHI, S.; YAMAZA, T. Cryopreserved dental pulp tissues of exfoliated deciduous teeth is a feasible stem cell resource for regenerative medicine. **PLoS One**, v. 7, n. 12, p. e51777, 2012.

Macikova, I.; Perzelova, A.; Mraz, P.; Bizik, I.; Steno, J. GFAP-positive astrocytes are rare or absent in primary adult human brain tissue cultures. *Biologia*, v. 64, n. 4, p. 833-839, 2009.

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. 527-539, 2010.

MAEHR, R.; CHEN, S.; SNITOW, M.; LUDWIG, T.; YAGASAKI, L.; GOLAND, R.; LEIBEL, R. L.; MELTON, D. A. Generation of pluripotent stem cells from patients with type 1 diabetes. **Proceedings of National Academy Science of United States of America**, v. 106, n. 37, p. 15768-15773, 2009.

MCNALLY, E. M.; DUGGAN, D.; GOROSPE, J. R.; BÖNNEMANN, C. G.; FANIN, M.; PEGORARO, E.; LIDOV, H. G.; NOGUCHI, S.; OZAWA, E.; FINKEL, R. S.; CRUSE, R. P.; ANGELINI, C.; KUNKEL, L. M.; HOFFMAN, E. P. Mutations that disrupt the carboxyl-terminus of gamma-sarcoglycan cause muscular dystrophy. **Human Molecular Genetics**, v. 5, n. 11, p. 1841-1847, 1996.

MEHLER, M. F. Brain dystrophin, neurogenetics and mental retardation. **Brain Research Reviews**, v. 32, p. 277-307, 2000.

MINCIACCHI, D.; DEL TONGO, C.; CARRETTA, D.; NOSI, D.; GRANATO, A. Alterations of the cortico-cortical network in sensori-motor areas of dystrophin deficient mice. **Neuroscience**, v. 166, n. 4, p. 1129-1139, 2010.

MARAGAKIS, N. J.; ROTHSTEIN, J. D. Mechanisms of Disease: astrocytes in neurodegenerative disease. **Nature Clinical Practice Neurology**, v. 2, n. 12, p. 679-89, 2006.

MIRANDA, R.; NUDEL, U.; LAROCHE, S.; VAILLEND, C. Altered presynaptic ultrastructure in excitatory hippocampal synapses of mice lacking dystrophins Dp427 or Dp71. **Neurobiology of Disease**, v. 43, n. 1, p. 134-41, 2011.

MIURA, M.; GRONTHOS, S.; ZHAO, M.; LU, B.; FISHER, L. W.; ROBEY, P. G.; SHI, S. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 10, p. 5807-5812, 2003.

MIZUNO, Y., OHAMA, E., HIRATO, J., NAKAZATO, Y., TAKAHASHI, H., TAKATAMA, M., TAKEUCHI, T. AND OKAMOTO, K. Nestin immunoreactivity of Purkinje cells in Creutzfeldt-Jakob disease. **Journal of Neurologic Science**, n. 246, p. 131-137, 2006.

MOIZARD, M. P.; BILLARD, C.; TOUTAIN, A.; BERRET, F.; MARMIN, N.; MORAIN, C. Are Dp71 and Dp140 brain dystrophin isoforms related to cognitive impairment in Duchenne muscular dystrophy? **American Journal of Medical Genetics**, v. 80, n. 1, p. 32-41, 1998.

MOURA, M. C. D. S.; WUTZKI, H. C.; VOOS, M. C.; RESENDE, M. B. D.; REED, U. C.; HASUE, R. H. Is functional dependence of Duchenne muscular dystrophy patients determinant of the quality of life and burden of their caregivers? **Arquivos de neuro-psiquiatria**, v. 73, n. 1, p. 52-57, 2015.

MUNTONI, F.; TORELLI, S.; FERLINI, A. Dystrophin and mutations: one gene, several proteins, multiple phenotypes. **The Lancet Neurology**, v. 2, n. 12, p. 731-740, 2003.

of mycoplasma contamination in cell cultures with Plasmocin. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v.2012, p. 267678, 2012.

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. 124-31, 2011.

PASSAMANO, L.; TAGLIA, A.; PALLADINO, A.; VIGGIANO, M.; D'AMBROSIO, P.; SCUTIFERO, M.; CECIO, M. R.; TORRE, V.; DE LUCA, F.; PICILLO, E.; PACIELLO, O.; PILUSO, G.; NIGRO, G.; POLITANO, L. Improvement of survival in Duchenne Muscular Dystrophy: retrospective analysis of 835 patients. **Acta Myologica**, v. 31, n. 2, p. 121, 2012.

PASSOS-BUENO MR, MARIE SK, MONTEIRO M, NEUSTEIN I, WHITTLE MR, VAINZOF M, ZATZ M. Knobloch syndrome in a large Brazilian consanguineous family: Confirmation of autosomal recessive inheritance. **American Journal of Medics Genetics**, v. 52, p. 170–173, 1994.

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.

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.

PIVORIŪNAS, A.; SUROVAS, A.; BORUTINSKAITE, V.; MATUZEVICCIUS, D.; TREIGYTE, G.; SAVICKIENE, J.; TUNAITIS, V.; ALDONYTE, R.; JARMALAVICCIUŪTE, A.; SURIKAITE, K.; LIUTKEVICCIUS, E.; VENALIS, A.; NAVAKAUSKAS, D.; NAVAKAUSKIENE, R.; MAGNUSSON, K. E. Proteomic analysis of stromal cells derived from the dental pulp of human exfoliated deciduous teeth. **Stem Cell Research and Therapy**, v. 1, n. 1, p. 5, 2010.

POUNTOS, I.; GIANNOUDIS, P. V. Biology of mesenchymal stem cells. **Injury**, v. 36, p. S8-S12, 2005.

RALL, S.; AND GRIMM, T. Survival in Duchenne muscular dystrophy. **Acta Myologica**, v. 31, n. 2, p. 117, 2012.

RAYA, Á.; RODRÍGUEZ-PIZÀ, I.; GUENECHEA, G.; VASSENA, R.; NAVARRO, S.; BARRERO, M. J.; CONSIGLIO, A. Disease-corrected haematopoietic progenitors from Fanconi anaemia induced pluripotent stem cells, **Nature**, v. 460, n. 7251, p. 53-59, 2009.

REINHARDT, P.; GLATZA, M.; HEMMER, K.; TSYTSYURA, Y.; THIEL, C. S.; HÖING, S.; MORITZ, S.; PARGA, J. A.; WAGNER, L.; BRUDER, J. M.; WU, G.; SCHMID, B.; RÖPKE, A.; KLINGAUF, J.; SCHWAMBORN, J. C.; GASSER, T.; SCHÖLER, H. R.; STERNECKERT, J. Derivation and expansion using only small molecules of human neural progenitors for neurodegenerative disease modeling. **PLoS One**, v. 8, n. 3, p. e59252, 2013.

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

ROBERTS, R. G.; COFFEY, A. J.; BOBROW, M.; BENTLEY, D. R. Exon structure of the human dystrophin gene. **Genomics**, v. 16, n. 2, p. 536-538, 1993.

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

SCHWARTZ, P. H.; BRYANT, P. J.; FUJA, T. J.; SU, H.; O'DOWD, D. K.; KLASSEN, H. Isolation and characterization of neural progenitor cells from post-mortem human cortex. **Methods in Molecular Biology**, v. 750, p. 61-77, 2011.

SEIFERT, G.; SCHILLING, K.; STEINHÄUSER, C. Astrocyte dysfunction in neurological disorders: a molecular perspective. **Nature Review Neuroscience**, v. 7, n. 3, p. 194-206, 2006.

SIEBZEHRUBL, F. A.; VEDAM-MAI, V.; AZARI, H.; REYNOLDS, B.A.; DELEYROLLE, L. P. Isolation and characterization of adult neural stem cells. **Biochemical and Biophysical Research Communation**, v. 375, n. 3, p. 303-7, 2008.

SNOW, W. M; ANDERSON, J. E.; JAKOBSON, L. S. Neuropsychological and neurobehavioral functioning in Duchenne muscular dystrophy: A review. **Neuroscience Biobehavioral Reviews**, v. 37, n. 5, p. 743-752, 2013.

SORRELL, J. M.; CAPLAN, A. I. Topical delivery of mesenchymal stem cells and their function in wounds. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 24, n.4, p.30, 2010.

STEIN, J. L.; DE LA TORRE-UBIETA, L.; TIAN, Y.; PARIKSHAK, N. N.; HERNÁNDEZ, I. A.; MARCHETTO, M. C.; BAKER, D. K.; LU, D.; HINMAN, C. R.; LOWE, J. K.; WEXLER, E. M.; MUOTRI, A. R.; GAGE, F. H.; KOSIK, K. S.; GESCHWIND, D. H.

A quantitative framework to evaluate modeling of cortical development by neural stem cells. **Neuron**, v. 83, n. 1, p. 69-86, 2014.

SZABÓ, A.; PEROU, C. M.; KARACA, M.; PERREARD, L.; PALAIS, R.; QUACKENBUSH, J. F.; BERNARD, P. S.

Statistical modeling for selecting housekeeper genes. **Genome Biology**, v. 5, n. 8, p. R59, 2004.

TADAYONI, R.; RENDON, A.; SORIA-JASSO, L. E.; CISNEROS, B.

Dystrophin Dp71: the smallest but multifunctional product of the Duchenne muscular dystrophy gene. **Molecular Neurobiology**, v. 45, n. 1, p. 43-60, 2012.

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. 861-72, 2007.

TOZAWA, T.; ITOH, K.; YAOI, T.; TANDO, S.; UMEKAGE, M.; DAI, H.; HOSOI, H.; FUSHIKI, S. The shortest isoform of dystrophin (Dp40) interacts with a group of presynaptic proteins to form a presumptivenovel complex in the mouse brain. **Molecular Neurobiology**, v. 45, n. 2, p. 287-297, 2012.

TRACEY, I.; SCOTT, R. B.; THOMPSON, C. H.; DUNN, J. F.; BARNES, P. R.; STYLES, P.; KEMP, G. J.; RAE, C. D.; PIKE, M.; RADDA, G. K. Brain abnormalities in Duchenne muscular dystrophy: phosphorus-31 magnetic resonance spectroscopy and neuropsychological study. **Lancet**, v. 345, n. 8960, p. 1260-1264, 1995.

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.

UPHOFF, C. C.; DENKMANN, S. A.; DREXLER, H. G. Treatment of mycoplasma contamination in cell cultures with Plasmocin. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, p. 267678, 2012.

VAILLEN, C.; UNGERER, A.; BILLARD, J. M. Facilitated NMDA receptor-mediated synaptic plasticity in the hippocampal CA1 area of dystrophin-deficient mice. **Synapse**, v. 33, n. 1, p. 59-70. 1999.

VAINZOF, M.; MOREIRA, E. S.; CANOVAS, M.; ANDERSON, L. V.; PAVANELLO, R. C.; PASSOS-BUENO, M. R.; ZATZ, M. Partial alpha-sarcoglycan deficiency with retention of the dystrophin-glycoprotein complex in a LGMD2D family. **Muscle Nerve**, v. 23, n. 6, p. 984-948, 2000.

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.

VILLARREAL-SILVA, M.; SUÁREZ-SÁNCHEZ, R.; RODRÍGUEZ-MUÑOZ, R.; MORNET, D.; CISNEROS, B. Dystrophin Dp71 is critical for stability of the DAPs in the nucleus of PC12 cells. **Neurochemical Research**, 35(3):366-73, 2010.

WAINER, B. J.; KISKINIS, E.; MELLIN, C.; WISKOW, O.; HAN, S. S.; SANDOE, J.; PEREZ, N. P.; WILLIAMS, L. A.; LEE, S.; BOULTING, G.; BERRY, J. D.; BROWN, R. H.; CUDKOWICZ, M. E.; BEAN, B. P.; EGGAN, K.; WOOLF, C. J. Intrinsic membrane hyperexcitability of amyotrophic lateral sclerosis patient-derived motor neurons. **Cell Reports**, v. 7, n. 1, p. 1-11, 2014.

WAITE, A.; BROWN, S. C.; BLAKE, D. J. The dystrophin-glycoprotein complex in brain development and disease. **Trends in Neurosciences**, v. 35, n. 8, p. 487-96, 2012.

WEBER, C.; FREIMARK, D.; PÖRTNER, R.; PINO-GRACE, P.; POHL, S.; WALLRAPP, C.; GEIGLE, P.; CZERMAK, P. Expansion of human mesenchymal stem cells in a fixed-bed bioreactor system based on non-porous glass carrier - Part

B: Modeling and scale-up of the system. **The International Journal of Artificial Organs**, v. 33, n. 11, p. 782-95, 2010.

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

YAHATA, N., ASAI, M., KITAOKA, S., TAKAHASHI, K., ASAKA, I., HIOKI, H., INOUE, H. (2011). Anti-A β drug screening platform using human iPS cell-derived neurons for the treatment of Alzheimer's disease. **PLoS One**, v. 6, n. 9, p. e25788, 2011.

YAHATA, N.; ASAI, M.; KITAOKA, S.; TAKAHASHI, K.; ASAKA, I.; HIOKI, H.; KANEKO, H. "Anti-A β drug screening platform using human iPS cell-derived neurons for the treatment of Alzheimer's disease." *PLoS One* 6, no. 9 (2011): e25788.

YAMAZA, T.; KENTARO, A.; CHEN, C.; LIU, Y.; SHI, Y.; GRONTHOS, S.; WANG, S.; SHI, S. Immunomodulatory properties of stem cells from human exfoliated deciduous teeth. **Indian Journal of Dental Research**, v. 23, n. 4, p. 558, 2010.

ZATZ, M.; VALLADA, H.; MELO, M. S.; PASSOS-BUENO, M. R.; VIEIRA, A. H.; VAINZOF, M.; GILL, M.; GENTIL, V. Cosegregation of schizophrenia with Becker muscular dystrophy: susceptibility locus for schizophrenia at Xp21or and effect of the dystrophin gene in the brain? **Journal of Medical Genetics**, v. 30, n. 2, p. 131-4, 1993.

ZHOU, S.; CHEN, L. Neural integrity is maintained by dystrophin in *C. elegans*. **The Journal of Cell Biology**, v. 192, n. 2, p. 349-363, 2011.