

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PABLO LEAL CARDOZO

**INVESTIGAÇÃO DOS IMUNOMODULADORES PRODUZIDOS
POR ASTRÓCITOS DERIVADOS DE CÉLULAS-TRONCO DE
PLURIPOTÊNCIA INDUZIDA (hIPSCs) DE PACIENTES COM
ESQUIZOFRENIA**

BELO HORIZONTE

2018

PABLO LEAL CARDOZO

**INVESTIGAÇÃO DOS IMUNOMODULADORES PRODUZIDOS
POR ASTRÓCITOS DERIVADOS DE CÉLULAS-TRONCO DE
PLURIPOTÊNCIA INDUZIDA (hIPSCs) DE PACIENTES COM
ESQUIZOFRENIA**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) como requisito para obtenção do título de mestre em Bioquímica e Imunologia

Orientadora: Profa. Dra. Fabíola M. Ribeiro (UFMG)

Co-orientador: Prof. Dr. Stevens K. Rehen (UFRJ/Instituto D'Or)

BELO HORIZONTE

2018

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu tio-avô Euripedes (Licinho), cuja trajetória de vida fez com que eu tivesse vontade de buscar respostas para a esquizofrenia, e à minha tia Marília por sempre ter cuidado dele com muito amor e carinho.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus e a Nossa Senhora por terem me dado a perseverança e capacidade necessária a conclusão deste trabalho.

Agradeço também a meus familiares, sobretudo a meus pais Sérgio e Ires e a meu irmão Pedro Henrique, pelo apoio constante que têm dado desde o início da minha caminhada, por terem sempre torcido por mim e ajudado a superar as dificuldades que a vida impõe a cada dia.

Aos Professores Fabíola e Stevens, agradeço por terem topado este projeto e terem aceitado me orientar durante o mestrado. Sem eles, este projeto teria ficado apenas no esboço e jamais teria se transformado nesta dissertação.

Aos meus colegas e amigos Isabela Olmo, Ana, Jéssica, Toniana, Juliana (Jumps), Ju Dória, Isaque, Pítia, Pablo Trindade, Marcelinho, Sylvie, Marcelão, Gabi, Cíntia e Leonardo Chycaibam sobretudo pela amizade, mas também por toda ajuda dada durante este mestrado, seja ao meu lado na bancada, seja com as valorosas discussões sobre meus dados e os próximos passos a serem dados neste projeto.

Aos demais amigos dos Laboratórios de Neurobioquímica, RNAi e do Instituto D'or agradeço pelo companheirismo e por toda contribuição dada, seja no simples fato de encher as caixinhas com ponteiras até mesmo a ajudar com as compras dos reagentes.

Ao Jamil pela gentileza e por estar sempre solícito a ajudar quando necessário.

Aos meus amigos Luís, Lucas, César, Marcelo, Mathias, Priscila, Flávia e os colegas do mestrado pela amizade, companheirismo, palavras de incentivo e boas risadas.

E finalmente à Bruna, Paul, Hannah e aos alunos do Clubes de Ciência pela experiência incrível que tive com eles nas férias de julho de 2017.

RESUMO

A esquizofrenia é uma desordem psiquiátrica, cuja causa é uma conjunção de fatores genéticos, ambientais e do desenvolvimento. Os indivíduos com esta doença apresentam um quadro clínico caracterizado por sintomas positivos (psicose, alucinações e delírios), negativos (depressão, pensamento e fala desordenados e perda de interesse social) e déficits cognitivos, exibindo também uma redução no volume de massa cinzenta. Análises microanatômicas sugerem que a redução na massa cinzenta deve-se à diminuição na quantidade de espinhas dendríticas. A redução na quantidade destas estruturas em esquizofrênicos provavelmente deve-se a uma exacerbação do processo de eliminação sináptica que ocorre normalmente na adolescência e durante o início da idade adulta. Recentemente, foi elucidado que moléculas do sistema imunológico, como as vias clássica do sistema do complemento e de CX3CL1/CX3CR1, atuam diretamente neste processo, levando à fagocitose das sinapses imaturas pela microglia. Além disso, foi demonstrado que astrócitos secretam citocinas capazes de modular a via do complemento e promover a poda sináptica. Diante disso e tendo em vista que infecções pré-natais atuam como fatores de risco para esquizofrenia, este trabalho objetivou analisar a produção de citocinas e CX3CL1 nos astrócitos derivados de células-tronco de pluripotência induzida (hiPSCs) de indivíduos esquizofrênicos estimulados por TNF- α . Os resultados demonstram que a cinética de produção dos transcritos para TNF- α e IL-1 β está alterada nos astrócitos de esquizofrênicos (SCZ) em relação aos astrócitos de indivíduos saudáveis (HC). Além disso, astrócitos SCZ produzem níveis basais aumentados de TGF- β 3 e cinética de transcrição de CX3CL1 atrasada em relação aos HC. Finalmente, a forma não secretada de CX3CL1 parece estar aumentada nos astrócitos SCZ, sugerindo problemas na liberação da sua forma secretada. Embora estes resultados devam ser vistos com cautela diante da limitação do tamanho da amostra, eles indicam que os astrócitos dos indivíduos SCZ produzem imunomoduladores de forma distinta quando comparados a indivíduos saudáveis.

PALAVRAS-CHAVE: Esquizofrenia; poda sináptica; astrócitos; hiPSC; TNF- α ; IL-1 β ; TGF- β 3; CX3CL1.

ABSTRACT

Schizophrenia is a psychiatric disorder, caused by a conjunction of genetic, environmental and developmental factors. Individuals bearing this disease exhibit cognitive deficits, positive (psychosis, hallucinations and delusions) and negative symptoms (depression, disordered thoughts and speech and loss of social drive), as well as reduced gray matter volume. Microanatomical analyses suggest that this gray matter reduction is due to diminished dendritic spine density. This decrease in spine density observed in schizophrenic patients likely happens because of exaggerated synaptic elimination, a process that normally occurs during adolescence and early adulthood. Recently, it has been shown that immune molecules, such as components of the classical complement cascade and CX3CL1/CX3CR1 pathway, play a direct role in this process, triggering the phagocytosis of immature synapses by microglia. Moreover, it has been demonstrated that astrocytes secrete cytokines capable of modulating the complement cascade and promoting synaptic pruning. Taking into account that pre-natal infection acts as a risk factor for schizophrenia, this work aimed at analyzing cytokines and CX3CL1 production employing induced pluripotent stem cells (iPSCs)-derived astrocytes from schizophrenic individuals after stimulation with TNF- α . The results demonstrate that TNF- α and IL-1 β transcripts production kinetics are altered in schizophrenic-derived (SCZ) astrocytes relative to healthy control-derived (HC) astrocytes. Also, SCZ astrocytes produce increased basal levels of TGF- β 3 and delayed CX3CL1 transcription kinetics relative to those of HC. Finally, non-secreted CX3CL1 levels seems to be increased in SCZ astrocytes, suggesting problems in the release of the soluble form. Even though these results should be regarded as preliminary due to the limited sample size, they clearly indicate that SCZ astrocytes produce immunomodulators in a distinct manner compared to HC astrocytes.

KEYWORDS: Schizophrenia; synaptic pruning; astrocytes; iPSC; TNF- α ; IL-1 β ; TGF- β 3; CX3CL1.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – A quantidade de espinhas dendríticas nos neurônios piramidais da camada 3 profunda do córtex pré-frontal dorsolateral (DLPFC) é reduzida em pacientes com esquizofrenia.

FIGURA 2 – A quimiocina CX3CL1 apresenta duas formas, uma ancorada à membrana plasmática e outra secretada.

Figura 3 - Células-tronco neurais (NSCs) em processo de diferenciação para astrócitos.

Figura 4 - Caracterização das linhagens de astrócitos de indivíduos controles (CF2 e 79A) com 5 semanas pós-diferenciação.

Figura 5 - Caracterização das linhagens de astrócitos de indivíduos esquizofrênicos (EZQ4 e 61B) com 5 semanas pós-diferenciação.

Figura 6 - Expressão de TNF- α , IL-1 β e TGF- β 3 em astrócitos HC e SCZ estimulados com 10 ng/mL de TNF- α .

Figura 7 - Expressão de CX3CL1 em astrócitos HC e SCZ estimulados com 10 ng/mL de TNF- α .

Figura 8 - Expressão da forma não secretada CX3CL1 em astrócitos HC e SCZ estimulados com 10 ng/mL de TNF- α .

Figura 9 - Diferenciação de células microglia-like induzidas (iMGs) a partir de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) de indivíduos saudáveis.

Figura 10 - Caracterização de iMGs para Pu.1, Iba1 e CX3CR1 por imunofluorescência.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Dados dos voluntários e pacientes dos quais as linhagens celulares foram obtidas.

Tabela 2 – Dados dos *primers* utilizados.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
1.1. Esquizofrenia	10
1.2. Mecanismos moleculares da poda sináptica	12
1.3. Imunomoduladores e a esquizofrenia	14
2. OBJETIVO GERAL	20
3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
4. MATERIAIS E MÉTODOS	21
4.1. Cultivo de células-tronco neurais (NSCs)	21
4.2. Diferenciação de NSCs em astrócitos	21
4.3. Obtenção e purificação de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) de indivíduos saudáveis	22
4.4. Diferenciação das iMGs a partir de PBMCs de indivíduos saudáveis	22
4.5. Estímulo dos astrócitos com TNF- α	23
4.6. Alinhamento da sequência do RNA mensageiro de TGF- β 3 murino no banco de dados de transcritos humanos	24
4.7. Transcrição reversa e PCR quantitativa	24
4.8. Extração de proteínas e <i>Western Blot</i>	24
4.9. Imunofluorescência	25
4.10. Análise de dados	26
5. RESULTADOS	27
5.1. Células-tronco neurais (NSCs) de indivíduos saudáveis e esquizofrênicos são capazes de gerar astrócitos maduros	27
5.2. Astrócitos de pacientes esquizofrênicos apresentam níveis alterados do mRNA de citocinas quando comparado aos controles	30
5.3. Astrócitos de indivíduos esquizofrênicos apresentam cinética de expressão alterada do mRNA de CX3CL1	31
5.4. Astrócitos de pacientes esquizofrênicos estimulados com TNF- α apresentam níveis alterados da forma não secretada de CX3CL1	33

5.5. Células microglia- <i>like</i> induzida foram geradas de forma bem-sucedida a partir de PBMCs de indivíduos saudáveis	34
6. DISCUSSÃO	37
7. CONCLUSÃO	42
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43
ANEXOS	50
Tabela 1 – Dados dos voluntários e pacientes dos quais as linhagens celulares foram obtidas	50
Tabela 2 – Dados dos <i>primers</i> utilizados	50
Parecer consubstanciado do CEP	51
Lista de publicações	55

1. INTRODUÇÃO

1.1. Esquizofrenia:

A esquizofrenia é uma desordem psiquiátrica, cujas causas estão associadas a fatores genéticos, socioambientais e do desenvolvimento neurológico. Geralmente, essa desordem se manifesta inicialmente durante a adolescência e início da vida adulta dos indivíduos e sua prevalência é de aproximadamente 1% na população mundial (PEREZ & LODGE, 2014; SIGURDSSON, 2015). Os pacientes acometidos podem apresentar um conjunto de sintomas que incluem: sintomas positivos (psicose, alucinações e delírios), sintomas negativos (depressão, pensamento e fala desordenados, perda de interesse social e alterações comportamentais) e déficits cognitivos (problemas de atenção, função executiva, memória verbal, memória de curto prazo e no aprendizado) (GEJMAN *et al*, 2011; PEREZ & LODGE, 2014; CANNON, 2015; SAKURAI *et al*, 2015; SIGURDSSON, 2015).

Estudos anatômicos, utilizando técnicas de imagem como ressonância magnética, mostraram alterações na estrutura cerebral de pacientes, quando comparados a indivíduos saudáveis. Estes estudos reportaram que, entre os esquizofrênicos, o volume dos ventrículos laterais é aumentado em cerca de 18-40%, enquanto que estimativas dão conta de uma redução no volume de matéria cinzenta e da massa cerebral total de 2-3% (FALUDI & MIRNICS, 2011; BAKHSHI & CHANCE, 2015). Adicionalmente, foi encontrada redução também no conteúdo da substância branca em algumas estruturas altamente envolvidas com processos cognitivos e de memória no sistema nervoso central, como o córtex pré-frontal e o hipocampo (LEVITT *et al*, 2010; BAKHSHI & CHANCE, 2015; CANNON, 2015). Neste sentido, as alterações na substância branca podem estar relacionadas a déficits na mielinização e no processo de diferenciação de oligodendrócitos em esquizofrênicos, como reportado por Uranova *et al* (2011) e Windrem *et al* (2017), respectivamente.

Dentre as primeiras hipóteses capazes de explicar a redução no volume da matéria cinzenta, destacam-se a redução na quantidade dos neurônios ou então a redução no seu tamanho e do neurópilo (espaço interneuronal, árvores dendríticas, axônios, sinapses e glia) a ele associado (BAKHSHI & CHANCE, 2015; BOSKA, 2015). É interessante notar que os achados mais consistentes corroboram a segunda

hipótese em detrimento da primeira, indicando que a redução na massa cerebral não adviria da perda de neurônios, mas sim de parte das suas estruturas. Além disso, foi observado que há redução na quantidade de espinhas dendríticas dos neurônios de pessoas com esquizofrenia em relação a indivíduos saudáveis (**Figura 1**), especialmente nas regiões mais associadas com esta doença, como o córtex pré-frontal dorsolateral, indicando a presença de um distúrbio na conectividade neuronal nesta desordem (GLANTZ & LEWIS, 2000; FALUDI & MIRNICS, 2011). Tendo em vista que há relação entre a complexidade da árvore dendrítica e o tamanho do corpo celular, foi reportado a redução de 9% no tamanho do soma dos neurônios em indivíduos com esquizofrenia (LEWIS, 2009; FALUDI & MIRNICS, 2011).

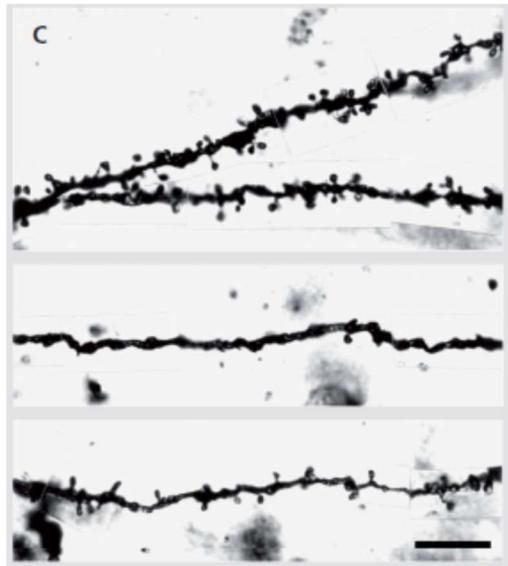


Figura 1 – A quantidade de espinhas dendríticas nos neurônios piramidais da camada 3 profunda do córtex pré-frontal dorsolateral (DLPFC) é reduzida em pacientes com esquizofrenia. Quando comparados aos controles (acima), os dendritos de pacientes com esquizofrenia (meio e abaixo) apresentam quantidade reduzida de espinhas dendríticas, o que pode alterar a conectividade e eficiência de transmissão de suas sinapses. *Fonte: LEWIS (2009).*

Diante disso, Feinberg (1983) propôs a hipótese de que a esquizofrenia seria causada pelo excesso de eliminação das sinapses neuronais. Este processo ocorre normalmente durante o desenvolvimento, com o ápice na adolescência, sendo responsável pelo refinamento das sinapses, removendo aquelas que estão imaturas e favorecendo aquelas mais fortes e capazes de propagar de maneira mais eficaz o estímulo nervoso (LEWIS, 2009; BOSKA, 2015; CANNON, 2015). Entretanto, este fenômeno, conhecido como poda sináptica, parece ser mais robusto em indivíduos com esquizofrenia, promovendo a diminuição significativa nas suas espinhas dendríticas e, com isso, reduzindo a conectividade entre suas células nervosas

(GLANTZ & LEWIS, 2000; LEWIS, 2009; FALUDI & MIRNICS, 2011; BAKHSHI & CHANCE, 2015; BOSKA, 2015; CANNON, 2015). Ainda, Cannon (2015) sugere que o excesso de poda sináptica nos pacientes com esquizofrenia estaria diretamente relacionado com o surgimento dos surtos psicóticos, característica marcante nas pessoas com esta desordem.

1.2. Mecanismos moleculares da poda sináptica

Embora Feinberg tenha proposto sua hipótese de que a esquizofrenia poderia ser causada pelo excesso da poda sináptica em 1983, apenas recentemente é que os mecanismos moleculares deste fenômeno começaram a ser elucidados. De fato, até o início dos anos 2000, sabia-se apenas que este fenômeno era dependente da atividade sináptica, sendo bloqueado através do uso da Tetrodoxina (TTX) que inibe a atividade neuronal (SHATZ & STRYKE, 1988).

Então, o estudo pioneiro publicado na revista *Science* por Huh e colaboradores (2000) demonstrou que moléculas do sistema imunológico, as quais acreditava-se anteriormente não serem expressas no cérebro, participam de maneira ativa no processo de eliminação sináptica. Neste estudo, foi utilizado como modelo para acessar a eliminação de sinapses a segregação espacial das projeções axonais provenientes das células ganglionares da retina (RGCs) sobre a porção dorsal do núcleo geniculado lateral (dLGN). Os autores mostraram que, durante o período do desenvolvimento no qual o refinamento das sinapses ocorre (entre o quarto e oitavo dias pós-natais), há a expressão de genes do Complexo Principal de Histocompatibilidade Classe I (MHC-I) no dLGN. Além de mostrar pela primeira vez a expressão de MHC-I no cérebro, este grupo demonstrou que, em animais deficientes para MHC-I, há déficits no processo de segregação dos terminais axonais dos olhos no dLGN. Este problema na segregação das sinapses foi acompanhado de alterações eletrofisiológicas, sendo que os animais *knockouts* (KO) para tal característica apresentaram incremento no processo de potenciação de longo prazo (LTP) dependente do receptor glutamatérgico de *N*-metil-D-aspartato (NMDA) e inabilidade em elicitar a depressão de longo prazo (LTD).

Posteriormente, o envolvimento das neuropentraxinas (BJARTMAR *et al*, 2006) e da via de ativação clássica do sistema do complemento (STEVENS *et al*, 2007) no processo de eliminação das sinapses foi elucidado. As neuropentraxinas

(NPs) são proteínas localizadas nas sinapses que possuem homologia com as pentraxinas do sistema imunológico e que atuam na opsonização e fagocitose de células mortas (SCHAFER & STEVENS, 2010). Utilizando o mesmo sistema experimental de segregação visual do dLGN, Bjartmar e colegas (2006) mostraram que em animais KO para NP-1, NP-2 e o receptor de NPs apresentam os mesmos déficits eletrofisiológicos e de segregação dos terminais observados para os animais deficientes em MHC-I.

O papel do sistema do complemento no processo de poda sináptica, por sua vez, tem sido mais bem estudado deste então. Inicialmente, Stevens *et al* (2007) mostrou que RGCs cultivadas em meio condicionado de astrócitos imaturos apresentavam aumento na expressão de todas as três subunidades (A, B e C) codificantes do componente C1q do complemento. Este componente, capaz de iniciar a via clássica do complemento, possui sua expressão altamente controlada durante o desenvolvimento, aumentando apenas nos períodos nos quais ocorre o refinamento sináptico e estando ausente em animais adultos saudáveis. Este grupo mostrou que C1q colocaliza-se tanto com marcadores dos terminais axonais dos neurônios pré-sinápticos quanto com proteínas presentes nas espinhas dendríticas dos neurônios pós-sinápticos. Além disso, este grupo mostrou que, na ausência deste fator do complemento, o refinamento sináptico ocorre de forma ineficaz, com os animais C1q KO apresentando problemas na segregação visual do dLGN e com os neurônios pós-sinápticos presentes no dLGN apresentando inervação por múltiplos terminais axonais provenientes das RGCs. Isto indica que tanto as sinapses mais consistentes quanto aquelas mais fracas estavam sendo mantidas nestes animais. Neste mesmo estudo, os autores mostraram que este processo de poda sináptica também era dependente do fator C3 do sistema do complemento.

Em seguida, outro trabalho do mesmo grupo, publicado por Schafer *et al* (2012), mostrou que a presença de C3 nas sinapses neuronais entre as terminações axonais de RGCs e as espinhas dendríticas dos neurônios do dLGN são reconhecidas pelo receptor CR3 presentes na superfície de microglias. Neste sentido, ao identificar a presença de C3, as microglias engolfam e ativamente fagocitam as sinapses neuronais. Em consonância com os resultados anteriores, este grupo mostrou que a via clássica do sistema do complemento atua identificando as sinapses mais fracas e que serão alvo da poda sináptica via fagocitose mediada por microglia.

Mais recentemente, Bialas e Stevens (2013) identificaram TGF- β 3 como o fator produzido pelos astrócitos imaturos capaz de promover o aumento na expressão de C1q durante o início do desenvolvimento pós-natal em camundongos. Além disso, o bloqueio dos receptores I e II de TGF- β (TGF- β RI e TGF- β RII, respectivamente) foram capazes de reprimir a elevação nos níveis de transcrito de C1q durante o período de desenvolvimento no qual ocorre a poda sináptica.

Finalmente, Paolicelli e colaboradores (2011) mostraram que em animais deficientes para o receptor de CX3CL1 (CX3CR1), o qual no sistema nervoso central (SNC) é unicamente expresso em microglias, há um atraso no processo de poda sináptica. Em animais selvagens, o processo de eliminação sináptico no hipocampo está concluído por volta do dia 15 pós-natal, enquanto nos animais CX3CR1 KO a quantidade de espinhas dendríticas presentes normaliza-se apenas por volta do dia 28 pós-natal. Como mostrado pelos autores, este atraso no refinamento das sinapses provavelmente ocorre em virtude de déficits na migração das microglias, tendo em vista que o ligante deste receptor é um fator quimiotático capaz de promover o seu recrutamento. Embora o número de espinhas dendríticas normalize-se durante o desenvolvimento, as alterações eletrofisiológicas e comportamentais são duradouras (PAOLICELLI *et al* 2011; ZHAN *et al*, 2014).

Este conjunto de dados observados na literatura científica indica que o processo de poda sináptica apresenta um intenso envolvimento de moléculas pertinentes ao sistema imunológico e a participação de células da glia. Assim, alterações na expressão dos genes codificantes para estas proteínas, bem como fatores que alterem o comportamento de células da glia, tornam-se alvos interessantes para estudo em desordens psiquiátricas no qual a poda sináptica pode estar alterada, como é o caso da esquizofrenia.

1.2. Imunomoduladores e a esquizofrenia

A esquizofrenia é tida como uma doença multifatorial, na qual um grande número de fatores genéticos de risco atua de forma cumulativa, com contribuição individual pequena, tornando o indivíduo susceptível ao desenvolvimento da doença (MÜLLER *et al*, 2015; NIMGAONKAR *et al*, 2017). Estes fatores, então, interagem com fatores ambientais alterando os padrões de desenvolvimento do indivíduo,

desencadeando a desordem em questão (NIMGAONKAR *et al*, 2017). Neste sentido, acredita-se que ao menos dois estressores ambientais sejam primordiais para o surgimento da doença: o primeiro seria o desencadeamento de um processo inflamatório na mãe durante o segundo semestre de gestação, capaz de primar às células da glia do feto, e o segundo seria um forte fator estressor durante o desenvolvimento pós-natal do indivíduo, promovendo uma resposta exagerada ao segundo estímulo apresentado (MÜLLER *et al*, 2015). Tendo em vista que tanto processos inflamatórios quanto estresses são capazes de levar à produção de citocinas pró-inflamatórias e que estas podem modular a sinalização glutamatérgica (especialmente através de receptores de NMDA) e, com isso, a atividade neuronal (MÜLLER *et al*, 2015), estes fatores tornam esta hipótese da etiologia da esquizofrenia bastante interessante para ser averiguada.

Em relação aos fatores genéticos que podem conferir risco aumentado para a esquizofrenia, vale ressaltar que nenhum deles possui alta penetrância e não são capazes de, quando presentes sozinhos, levarem ao surgimento da doença. Contudo, sua presença aumenta a susceptibilidade dos indivíduos em desenvolver a esquizofrenia. Dentre os principais fatores de risco associados à esquizofrenia podemos citar os polimorfismos identificados nos genes que codificam para *COMT*, *DAOA*, *DTNBP1*, *NRG1*, *DISC1*, *BDNF*, *MHC* e *C4A* (RIDLEY & KENDLER, 2006; BERGEN *et al*, 2012; ZHANG *et al*, 2015; SEKAR *et al*, 2016). Estes dois últimos genes são peculiares dado o envolvimento de MHC-I e do sistema do complemento no processo de refinamento sináptico.

No que tange ao envolvimento de *C4A* como fator de risco da esquizofrenia, Sekar *et al* (2016) também verificaram os níveis de RNA mensageiro (mRNA) de *C4A* e da proteína por ele produzida no cérebro *post-mortem* de indivíduos com esquizofrenia. Os autores não apenas detectaram uma maior quantidade do transcrito no cérebro de indivíduos com a desordem quando comparado a indivíduos saudáveis, mas também identificaram que C4 localiza-se junto às sinapses. Tendo em vista que C4 faz parte, junto com C2, do complexo proteico (C3 convertase) responsável por converter C3 na sua forma ativa e que pode desencadear o processo de fagocitose pelo sistema imune (NIMGAONKAR *et al*, 2017), estes dados sugerem a forte associação de *C4A* como fator de risco para o surgimento da esquizofrenia.

Além disso, outros estudos apontaram alterações nos níveis de mRNA e proteína de citocinas pró-inflamatórias em pacientes esquizofrênicos. De fato, estudos

apontaram níveis elevados do mRNA IL-6 e TNF- α , bem como dos níveis séricos de IL-6 e dos receptores solúveis de TNF- α (sTNFR1 e sTNFR2) em esquizofrênicos (WATANABE *et al*, 2010; FINEBERG & ELLMAN, 2013; RODRIGUES-AMORIM *et al*, 2017). Por sua vez, níveis aumentados de IL-8 em gestantes foram associados com risco aumentado de desenvolvimento da esquizofrenia no feto, tendo sido registrado redução no volume cerebral e aumento dos ventrículos na prole esquizofrênica (MÜLLER *et al*, 2015). Em relação aos níveis de IL-1 β , outra importante citocina pró-inflamatória, os resultados têm sido inconsistentes. Alguns estudos mostram aumento nos níveis da proteína no soro ou líquido dos pacientes e presença de polimorfismos conferindo risco elevado para o desenvolvimento da esquizofrenia, enquanto outros indicam que não existe associação entre tais polimorfismos e a doença, bem como que não há alterações nos níveis proteicos desta citocina no soro nem no líquido dos portadores desta enfermidade (FINEBERG & ELLMAN, 2013; WANG *et al*, 2015).

Interessantemente, Bergon *et al* (2015) conduziram um estudo de meta-análise no qual identificaram que CX3CR1 apresenta expressão reduzida no cérebro e no sangue de pacientes com esquizofrenia, sendo que esta análise foi validada através de ensaios de RT-qPCR. Este dado é notório no contexto da esquizofrenia, tendo em vista que Paolicelli *et al* (2011) mostrou o envolvimento deste receptor no processo de poda sináptica. Ademais, tendo em vista que esta proteína é unicamente expressa em microglias no SNC, a alteração de sua expressão indica fortemente o envolvimento deste tipo celular nas alterações do desenvolvimento observadas em pacientes com esquizofrenia.

Outro fenômeno relevante que poderia estar associado à alteração na expressão de imunomoduladores na esquizofrenia é o fato de que infecções pré-natais constituem um importante fator de risco ambiental para esta doença (MÜLLER *et al*, 2015). De fato, estudos de meta-análise indicam que há um aumento no risco de desenvolvimento desta desordem em mães que, durante o segundo trimestre da gestação, se infectaram com rubéola, influenza, toxoplasma ou herpes vírus (HSV-2) (BROWN, 2006; MÜLLER *et al*, 2015). Ainda, tendo em vista que nem todos estes patógenos são capazes de cruzar a barreira transplacentária, propõe-se que os efeitos promovidos pela infecção pré-natal na prole devam-se ao rol de citocinas pró-inflamatórias liberados durante o processo infeccioso (BROWN, 2006; FINEBERG & ELLMAN, 2013; MÜLLER *et al*, 2015).

Diante disso, alguns estudos utilizaram-se deste conhecimento para modelar este fator ambiental associado à esquizofrenia. Notavelmente, Moreno e colaboradores (2011) identificaram alterações nos padrões de expressão e funcionalidade de receptores de serotonina e glutamato em animais cujas mães foram infectadas com influenza, recapitulando alguns aspectos observados na esquizofrenia. Além disso, Canetta *et al* (2016) demonstraram que animais submetidos a este modelo de ativação imunológica materna (AIM) geravam prole com alterações eletrofisiológicas nos interneurônios parvalbumina-positivos do córtex pré-frontal, provavelmente em virtude da redução da expressão deste gene e de *GAD67*, uma das isoformas que codifica o gene responsável pela síntese do neurotransmissor inibitório GABA. Notoriamente, estes dados estão em consonância com o observado anteriormente no córtex pré-frontal de pacientes com esquizofrenia, no qual foi observado que estes indivíduos apresentam níveis reduzidos desta enzima e de parvalbumina nos interneurônios desta região (LISMAN *et al*, 2008; LEWIS, 2009).

Dentre os achados mais importantes no que tange aos possíveis mecanismos que podem estar alterados na poda sináptica na esquizofrenia, destaca-se aquele obtido por Mattei e colegas (2017). Neste trabalho, os autores mostraram que microglias de camundongos adultos, cujas genitoras foram submetidas ao AIM, apresentam perfil de transcrição alterado no hipocampo. A análise do transcriptoma destes animais quando adultos revelou que as células microgлияis dos mesmos apresentam um perfil de sinalização pró-inflamatório aumentando. Neste sentido, os níveis de CD18, que constitui parte do receptor do componente C4 do sistema do complemento, está elevado. Estes dados indicam que as microglias da prole de animais submetidos ao AIM aparentam estar mais ativadas, com o fenótipo persistindo até a idade adulta, corroborando os achados obtidos em análises de tomografia de emissão de pósitrons (PET) e tecidos *post-mortem* em indivíduos esquizofrênicos (LASKARIS *et al*, 2016).

Durante um processo inflamatório, as microglias reagem imediatamente a tais estímulos, sejam eles diretos, como a detecção de lipopolissacarídeos bacterianos (LPS) ou vírus, ou indiretos, pela detecção de citocinas pró-inflamatórias provenientes da periferia (LIU *et al*, 2011). Nesta situação, as microglias saem do seu estado de vigilância e tornam-se ativadas, retraíndo seus inúmeros processos e apresentando morfologia arredondada. Junto a estas alterações morfológicas, as microglias ativadas passam a secretar uma miríade de citocinas pró-inflamatórias,

incluindo TNF- α , IL-1, IL-6 e IFN- γ . Adicionalmente, estas citocinas pró-inflamatórias, produzidas por microglia, podem atuar modulando a atividade dos astrócitos, tornando-os ativos, que, em sequência, podem ajudar na ativação de microglias que se localizam longe do sítio inicial do processo inflamatório (LIU *et al*, 2011; LIDDELOW *et al*, 2017).

Assim sendo, Liddelow e colegas (2017) mostraram que microglias ativadas por LPS secretam fatores (i.e., TNF- α , IL-1 α e C1q) capazes de converter astrócitos quiescentes em astrócitos do tipo A1 ativados, cujo fenótipo é neurotóxico, podendo promover a morte neuronal, bem como a destruição de sinapses. Estes astrócitos reativos do tipo A1, ao promover a perda de sinapses neuronais, alteram os padrões eletrofisiológicos de neurônios adjacentes, como a redução nos correntes excitatórias pós-sinápticas de miniatura (mEPSCs), além de apresentarem níveis elevados do mRNA do fator C3 do complemento. Surpreendentemente, quando astrócitos *naive* foram expostos a IL-1 β , uma citocina pró-inflamatória clássica, o fenótipo observado foi o oposto, com os astrócitos polarizados para um perfil de ativação mais neuroprotetor, conhecido como astrócitos do tipo A2. Apesar disso, outros estudos mostraram que IL-1 β também é capaz de promover o aumento da expressão de C3 (MARANTO *et al*, 2011), o que não foi averiguado por Liddelow *et al* (2017).

Além do mais, CX3CL1, o ligante do receptor CX3CR1, que está envolvido no processo de poda sináptica, tem sua expressão modulada por TNF- α e IFN- γ em astrócitos humanos (YOSHIDA *et al*, 2001). Neste trabalho, os autores mostraram que estas duas citocinas agem sinergisticamente aumentando os níveis do transcrito de CX3CL1 e de proteína no meio de cultura dos astrócitos. É interessante notar que esta quimiocina é inicialmente produzida como uma proteína transmembrana, sendo convertida na sua forma secretada através da clivagem mediada pelas metaloproteases ADAM10 e ADAM17 (**Figura 2**), sendo que esta última exerce sua atividade especialmente em condições inflamatórias (WOLF *et al*, 2013).

Tendo em vista que as citocinas pró-inflamatórias secretadas por microglia em ocasião de um processo inflamatório podem atuar regulando a expressão de imunomoduladores envolvidos no processo de poda sináptica em astrócitos e que estes últimos atuam amplificando o processo inflamatório no SNC, seria interessante investigar se astrócitos de indivíduos esquizofrênicos, estimulados com TNF- α ,

produzem CX3CL1 e outras citocinas de forma distinta, quando comparados à astroglia de pessoas saudáveis.

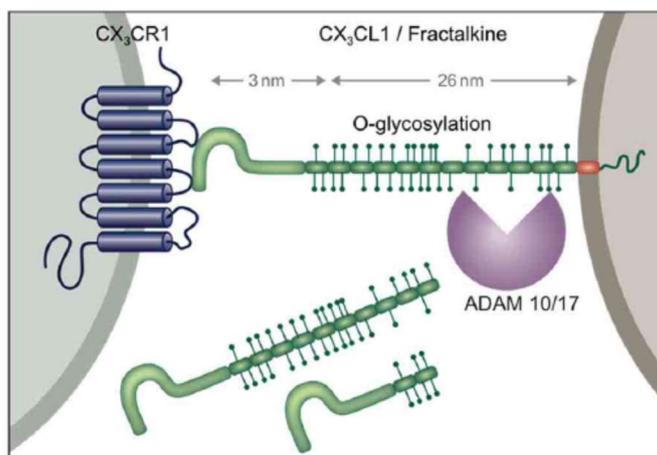


FIGURA 2 – A quimiocina CX3CL1 apresenta duas formas, uma ancorada à membrana plasmática e outra secretada. CX3CL1, também conhecida como fractalquina, é produzida em neurônios e astrócitos como uma proteína transmembrana, possuindo um pequeno domínio intracelular, seguido de um domínio transmembrana e da porção extracelular altamente glicosilada contendo o domínio quimiotático. Sua porção extracelular pode ser clivada por meio da ação das metaloproteases ADAM10 e ADAM17, produzindo a forma secretada da quimiocina. Tanto sua forma de membrana, quanto sua forma secretada são capazes de ativar seu receptor, CX3CR1, na superfície das microglias no sistema nervoso central. *FONTE: Wolf et al (2013).*

Embora estudos com indivíduos *post-mortem* e animais tenham auxiliado no entendimento da esquizofrenia, estes modelos não são capazes de reproduzir determinados aspectos celulares e bioquímicos da doença. O primeiro modelo não consegue recapitular aspectos do desenvolvimento da doença, fornecendo indícios apenas do seu estágio terminal (JACOBS, 2015). Por sua vez, embora os modelos animais permitam a análise de alguns fatores de risco ambientais, eles falham na modelagem das complexas características genéticas inerentes à esquizofrenia (BRENNAND & GAGE, 2011; BRENNAND *et al*, 2013). Diante disso, neste estudo utilizamos astrócitos derivados de células-tronco de pluripotência induzida humanas (hiPSCs) de indivíduos saudáveis e esquizofrênicos a fim de recapitular a complexidade genética da doença, enquanto o estímulo com TNF- α mimetizaria um dos fatores de risco ambientais capazes de induzir uma resposta pró-inflamatória. Por fim, objetivamos estabelecer também um modelo capaz de gerar células microglia-*like* a partir de células mononucleares do sangue a serem utilizadas futuramente para estudos *in vitro* de poda sináptica na esquizofrenia.

2. OBJETIVO GERAL

Investigar os níveis dos imunomoduladores produzidos por astrócitos derivados de células-tronco de pluripotência induzida (hiPSCs) de pacientes com esquizofrenia diante de estimulação com TNF- α .

3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 3.1.** Diferenciar astrócitos de indivíduos saudáveis e esquizofrênicos a partir de células-tronco neurais (NSCs) derivadas de hiPSCs;
- 3.2.** Verificar a cinética de expressão do mRNA das citocinas TNF- α , IL-1 β e TGF- β 3 em astrócitos de controles e esquizofrênicos estimulados com TNF- α ;
- 3.3.** Verificar a cinética de expressão do mRNA da quimiocina CX3CL1 em astrócitos de controles e esquizofrênicos estimulados com TNF- α ;
- 3.4.** Analisar a produção da forma não-secretada de CX3CL1 em astrócitos de controles e esquizofrênicos estimulados com TNF- α ;
- 3.5.** Estabelecer um protocolo de produção de células *microglia-like* induzidas (iMGs) a partir de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) de indivíduos saudáveis.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Cultivo das Células-tronco Neurais (NSCs)

As células-tronco neurais (NSCs), derivadas das células-tronco de pluripotência induzida humanas (hiPSCs), de indivíduos saudáveis e esquizofrênicos (**TABELA 1, no anexo**), foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Stevens K. Rehen (UFRJ/Instituto D'Or). As NSCs foram plaqueadas na densidade de $2,0 \times 10^6$ células e cultivadas em placas de cultura celular de 60 mm (Sarstedt), previamente tratadas com Geltrex 1x (Gibco) por 30 minutos a 37°C , em meio de expansão de NSCs (50% Advanced DMEM/F12 [Gibco], 50% Neurobasal [Gibco], Suplemento de Indução Neural 1x [Gibco]) com 1% de penicilina-estreptomicina (Gibco). Este meio de cultura foi trocado a cada 2 dias até que a cultura atingisse 100% de confluência, quando foram utilizadas em ensaios posteriores. As células foram mantidas em estufa umidificada, a 37°C e 5% de CO_2 .

4.2. Diferenciação das NSCs em astrócitos

O protocolo de diferenciação dos astrócitos a partir de NSCs foi realizado como descrito por Yan *et al* (2013). Após atingirem 100% de confluência, a monocamada de NSCs foi lavada com Solução tamponada de fosfato sem cálcio e sem magnésio (PBS 1x ^{-/-}) por duas vezes e em seguida incubada com Solução de Accutase (Gibco) por 5 minutos a temperatura ambiente. Após terem se desprendido da placa, as NSCs foram coletadas e transferidas para um tubo cônico de 15 mL (Sarstedt), onde foram submetidas a centrifugação a 300 g por 4 minutos. O sobrenadante foi descartado, as células ressuspensas em meio de diferenciação de astrócitos (DMEM/F12 [Gibco], suplemento N-2 1x [Gibco], 1% de soro fetal bovino [Gibco]) com 1% de penicilina-estreptomicina e plaqueadas na densidade de $1,25 \times 10^6$ células em garrafas de 25 cm^2 previamente tratadas com Geltrex 1x como descrito anteriormente. As células foram mantidas nestas condições durante 3 semanas, com troca do meio de cultura a cada 2-3 dias. Durante este período, sempre que as células atingiam 100% de confluência, as mesmas eram passadas, como descrito para as NSCs, para garrafas de 75 cm^2 (Sarstedt) e, em seguida, de 175 cm^2 (Sarstedt), também tratadas com Geltrex 1x. Findado o período de diferenciação, os astrócitos imaturos (1 semana pós-diferenciação) foram passados para novas garrafas de 175

cm², tratados previamente com Geltrex 0,5x, e em seguida para garrafas de igual tamanho sem tratamento com Geltrex, de modo a estimular a seleção negativa de células não diferenciadas (não aderentes na ausência de Geltrex). Durante este período de seleção até sua completa maturação (5 semanas pós-diferenciação), os astrócitos foram cultivados em meio DMEM/F12, contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% penicilina-estreptomicina. Terminado este período, as células foram submetidas às análises de imunofluorescência para EAAT1, Vimentina, GFAP e S100β de modo a confirmar sua identidade como astrócitos e, então, utilizadas para experimentos subsequentes. As células foram mantidas em estufa umidificada, a 37 °C e 5% de CO₂. As fotografias de campo claro foram obtidas no microscópio EVOS XL (Thermo Scientific).

4.3. Obtenção e purificação de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) de indivíduos saudáveis

Entre 30 e 50 mL de sangue de 3 indivíduos saudáveis foram coletados em tubos contendo heparina sódica, transferidos para tubos cônicos de 50 mL (Sarstedt) e diluídos na proporção 1:1 em PBS 1x ^{-/-}. Em seguida, este sangue diluído foi adicionado sobre 10 mL do gradiente Histopaque 1077 (Sigma-Aldrich) e submetido à centrifugação a 900 g por 25 minutos, com a aceleração e a frenagem da centrífuga desligadas. Findada esta etapa, a fase entre o plasma e o Histopaque 1077, contendo o anel com as células mononucleares do sangue periférico (PBMCs), foram aspiradas com o auxílio de uma pipeta de transferência e adicionadas em um novo tubo cônico de 50 mL. Em seguida, o volume total foi completado para 50 mL com PBS 1x ^{-/-} e as células centrifugadas a 400 g por 8 minutos para remoção de contaminantes. Esta etapa de lavagem foi repetida mais uma vez e, em seguida, as PBMCs foram plaqueadas para diferenciação em células micróglia-like induzidas (iMGs). Este procedimento foi feito de acordo com a Resolução do Conselho Nacional de Saúde 466/12 e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Copa D'or (número: 32385314.9.0000.5249).

4.4. Diferenciação das iMGs a partir de PBMCs de indivíduos saudáveis

A diferenciação das iMGs a partir de PBMCs foi realizada como descrito por Ohgidani *et al* (2014) e posteriormente modificado por Sellgren *et al* (2016). Cerca de 4×10^5 PBMCs foram plaqueadas em placas de 24 poços (com lamínulas de plástico) (Sarstedt) previamente tratadas com Geltrex 1x, como já descrito, em meio RPMI 1640 (Gibco) com 10% de SFB, Glutamax 1x (Gibco) e 1% de penicilina-estreptomicina. No dia seguinte, as células não aderentes foram removidas por aspiração e o meio de indução de células microglia-like (RPMI 1640 com Glutamax 1x, 1% de penicilina-estreptomicina e Interleucina-34 [IL-34; Biolegend] e fator estimulador de colônia de granulócitos [GM-CSF; Biolegend] nas concentrações finais de 100 ng/mL e 10 ng/mL, respectivamente). Após 9 dias de diferenciação, o meio de cultura foi removido, a monocamada celular lavada por duas vezes com PBS 1x^{-/-} e meio de indução de células microglia-like fresco adicionado. Após 12 dias de diferenciação, as iMGs foram fixadas e utilizadas para análise de imunofluorescência para IBA1, PU.1 e CX3CR1. As células foram mantidas em estufa umidificada, a 37 °C e 5% de CO₂. As fotografias de microscopia de campo claro foram obtidas com o microscópio EVOS FLOID CELL IMAGING STATION (Thermo Scientific).

4.5. Estímulo dos astrócitos com TNF- α

Astrócitos diferenciados de indivíduos saudáveis e pacientes esquizofrênicos, com ao menos 5 semanas pós-diferenciação, foram cultivados em placas de 6 poços (Sarstedt) ou em garrafas de 25 cm², na densidade de 8×10^3 células/cm², em meio DMEM/F-12 com 10% SFB e 1% de penicilina-estreptomicina até atingirem a confluência de 70%. Em seguida, o meio de cultura foi removido e a monocamada de células foi lavada por 3 vezes com PBS 1x^{-/-} para remoção do excesso de SFB. Então, os astrócitos foram carenciados por 24 h em meio de cultura desprovido de SFB. Após este período, o fator de necrose tumoral α (TNF- α ; Biolegend) foi adicionado na concentração final de 10 ng/mL e mantido por 1,5, 3, 4,5, 6 e 24 h para as análises de expressão de mRNA e durante 6, 24 e 48 h para análise de CX3CL1 por *western blot*. Aos controles não estimulados foi adicionado solução de BSA 1% (m/v) pareado ao tempo mais longo de incubação dos respectivos experimentos.

4.6. Alinhamento da sequência do RNA mensageiro de TGF- β 3 murino no banco de dados de transcritos humanos

A sequência de nucleotídeos correspondente ao RNA mensageiro (mRNA) de TGF- β 3 murino (sequência de referência no NCBI: NM_009368.3) foi submetida a um Blastn (NIH) para detecção da isoforma correspondente em humanos. Foi utilizado o banco de dados contendo as sequências de RNA de referência (refseq_rna) de humanos (taxid: 9606). A ferramenta foi utilizada, pois permite a comparação das sequências de mRNA entre espécies. Nenhum outro parâmetro foi alterado para o alinhamento de sequências. A sequência correspondente ao melhor alinhamento foi determinada por possuir o menor valor E, maior percentual de identidade e cobertura entre as sequências analisadas.

4.7. Transcrição reversa e PCR quantitativa

Findado o tempo de estimulação dos astrócitos com TNF- α , a extração do RNA total foi realizada pelo método de TRIzol, como descrito pelo fabricante (Thermo Fisher). Em seguida, o RNA total foi quantificado no Multiskan GO Microplate (Thermo Scientific) e 1 μ g foi submetido à transcrição reversa em mix de reação total de 20 μ L (15 ng/ μ L de *primers* randômicos, 50 mM Tris-HCl, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 625 μ M dNTPs, 10 μ M DTT e transcriptase reversa em água livre de nucleases), nas seguintes condições: 70 °C por 10 min, 4 °C por 10 minutos, 42 °C por 1 h e 70 °C por 15 min. Em seguida, o cDNA (DNA complementar) resultante foi submetido à PCR quantitativa para CX3CL1, IL-1 β , TNF- α , TGF- β 3 e GAPDH (*primers* disponíveis na **TABELA 2 do anexo**), utilizando o sistema QuantStudio 7 (Applied Biosystems), em 10 μ L de reação (10 mM Tris, 50 mM KCl, 0,01% Triton X-100, 1,5 mM MgCl₂, 200 μ M dNTPs, 200 nM *primers* senso e antissenso, SyBr Green [Applied Biosystems] e Taq DNA Polimerase), nas seguintes condições: 95 °C por 3 minutos, 40 ciclos (95 °C por 15 segundos, 60 °C por 15 segundos, 72 °C por 15 segundos), 95 °C por 15 segundos.

4.8. Extração de proteína e *Western Blot*

Após o fim da estimulação dos astrócitos de indivíduos controles e esquizofrênicos com TNF- α , seu meio de cultura foi removido, a monocamada de

células lavada por três vezes com PBS 1x^{-/-} gelado e as proteínas totais extraídas com o uso do tampão RIPA (NaCl 150 mM, 1% de NP-40, 0,5% de deoxicolato de sódio, 0,1% de SDS, Tris 50 mM, pH 8,0) contendo inibidores de protease e fosfatase (Sigma-Aldrich). Em seguida, a quantidade das proteínas totais foi quantificada pelo método de Bradford (Bio-Rad) e 50 µg foi submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5%. Em seguida, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose, bloqueadas com solução de BSA 5% (m/v) em solução tamponada de Tris com Tween-20 0,1% (TBST) por 1 h e incubadas com os anticorpos primários para CX3CL1 (monoclonal, 1:500, R&D Systems, MAB3651-100) e β-actina (monoclonal, 1:5000, Sigma-Aldrich, A-5316) em solução de BSA 3% (m/v) em TBST, *overnight*, sob agitação e a 4 °C. No dia seguinte, as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário Anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase (policlonal, 1:2500, Millipore) em Leite em pó 3% em TBST, por 1 h, sob agitação e a temperatura ambiente. Findado este período, as membranas foram incubadas no reagente ECL Plus (GE Healthcare) e a detecção por quimioluminescência realizada no ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare).

4.9. Imunofluorescência

As placas de 96 poços contendo os astrócitos e as lamínulas contendo as iMGs foram fixadas em solução tamponada de paraformaldeído 4% (m/v) por 20 min e em seguida lavadas três vezes com PBS 1x por 5 min. Após este período, as células foram permeabilizadas com solução de Triton X-100 0,3% (v/v) em PBS 1x (PBST) por 15 minutos e, em seguida, bloqueada em solução de BSA 2% (m/v) em PBST por 1 h sob agitação. Após este período, os astrócitos foram incubados com os anticorpos primários: GFAP (policlonal, 1:500, Dako, Z033401-2), Vimentina (monoclonal, 1:2000, Abcam, ab92547), EAAT1 (policlonal, 1:100, Abcam, ab416) e S100β (monoclonal, 1:1000, Abcam, ab52642); já as iMGs foram incubadas com os seguintes anticorpos primários: Iba1 (policlonal, 1:750, Invitrogen, PA5-21274), Pu.1 (monoclonal, 1:200, Cell Signaling, 2258S) e CX3CR1 (policlonal, 1:500, Abcam, ab8021). Esta incubação transcorreu *overnight* a 4 °C. Em seguida, as células foram lavadas com PBST por três vezes, sob agitação durante 5 min e, então, incubadas ao abrigo da luz com os anticorpos secundários anti-IgG rabbit Alexa 546 (policlonal,

1:300, Life Technologies, A-11010), anti-IgG rabbit 594 (policlonal, 1:400, Invitrogen, A-11001), anti-IgG mouse 488 (policlonal, 1:400, Invitrogen, A-11001), Hoescht ou DAPI. Posteriormente, as células foram novamente lavadas como descrito. Às placas contendo os astrócitos foi adicionado glicerol como meio de montagem e as células foram visualizadas no Operetta HCS (PerkinElmer). Por sua vez, as lamínulas contendo as iMGs foram montadas em lâminas de vidro com o uso do meio de montagem Hydromount (National Diagnostics) e visualizadas no microscópio confocal Nikon C2.

4.10. Análise dos dados

Os gráficos foram plotados utilizando-se o *software* GraphPad Prism 5 (versão 5.03) e as imagens usando o software FIJI ImageJ (NIH; versão 1.51s).

5. RESULTADOS

5.1. Células-tronco neurais (NSCs) de indivíduos saudáveis e esquizofrênicos são capazes de gerar astrócitos maduros

As células-tronco neurais das linhagens controle (CF2 e 79A) e esquizofrênicas (EZQ4 e 61B) (**Figuras 3A e 3D**) foram submetidas ao protocolo de diferenciação de astrócitos durante três semanas (**Figuras 3B e 3E**). Estes foram, posteriormente, amadurecidos durante mais cinco semanas (**Figuras 3C e 3F**). Findado este período, estas células foram caracterizadas por imunofluorescência para EAAT1 (também conhecido como GLAST), Vimentina, GFAP e S100 β com o intuito de verificar sua identidade como células astrogliais. Como pode ser observado nas **Figuras 4 e 5**, as células foram positivas para todos marcadores, confirmando se tratarem de astrócitos (SOFRONIEW & VINTERS, 2010).

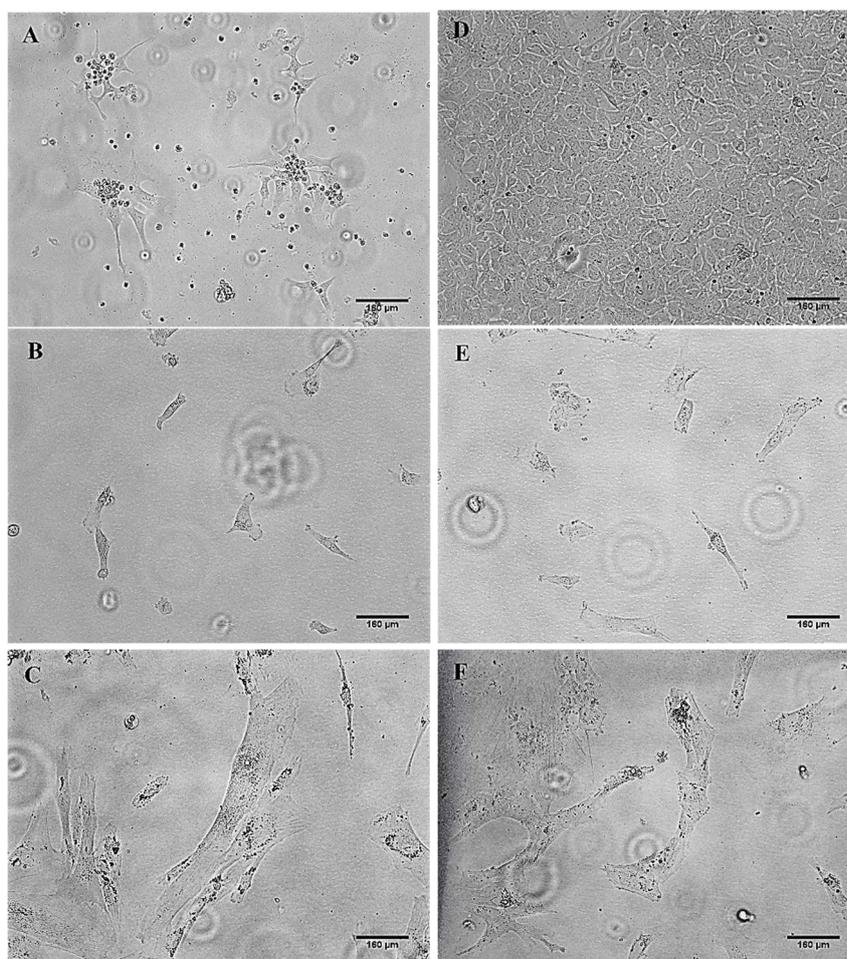


Figura 3 - Células-tronco neurais (NSCs) em processo de diferenciação para astrócitos. (A) NSCs EZQ4 (em baixa confluência) e (D) CF2 (em alta confluência) antes do início do processo de diferenciação. (B) Astrócitos EZQ4 e (E) CF2 imaturos com 1 semana pós-diferenciação. (C) Astrócitos EZQ4 e (F) CF2 após processo de amadurecimento com 5 semanas pós-diferenciação. *Imagens de microscopia de campo claro. Barra de escala igual a 160 µm.*

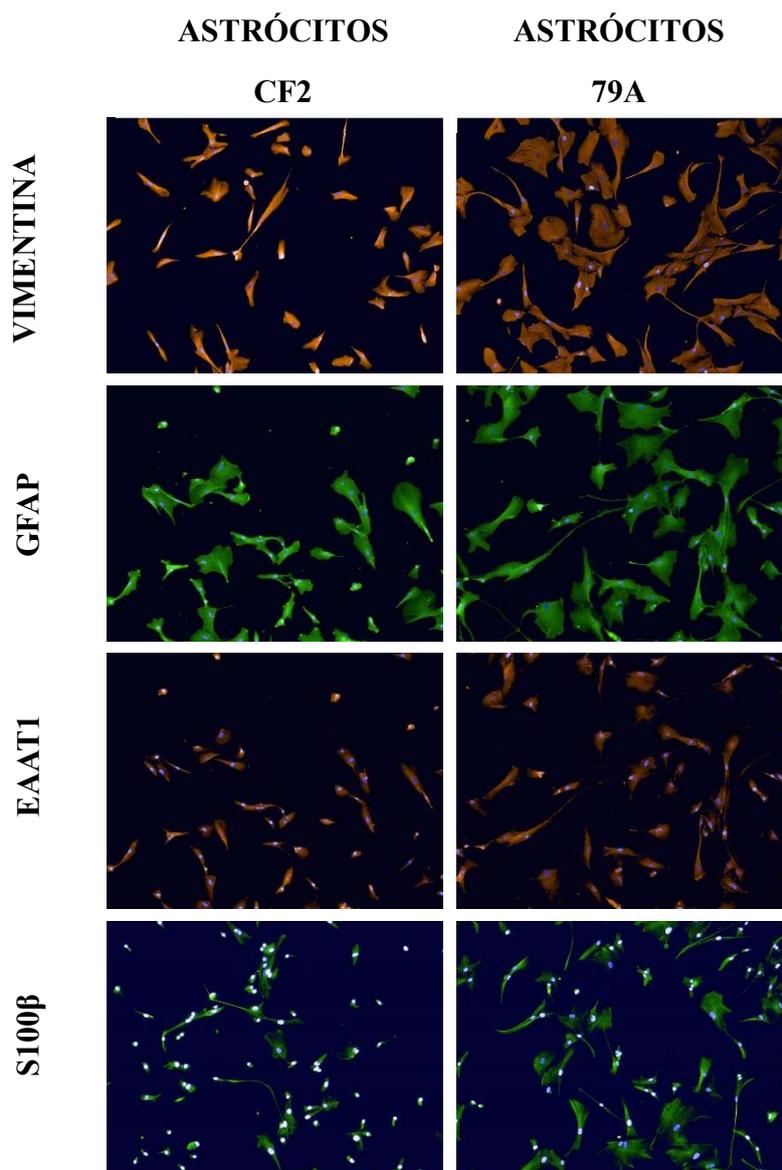


Figura 4 - Caracterização das linhagens de astrócitos de indivíduos controles (CF2 e 79A) com 5 semanas pós-diferenciação. Após o processo de diferenciação e amadurecimento terem sido concluídos, astrócitos de indivíduos controles foram caracterizados por imunofluorescência. Marcação dos Astrócitos CF2 (painéis da esquerda) e 79A (painéis da direita) para Vimentina, GFAP, EAAT1 e S100 β . *Imagens de microscopia de fluorescência. As marcações para as proteínas-alvo estão representadas nas cores verde ou laranja, enquanto o núcleo, marcado com DAPI, está em azul. GFAP: Proteína ácida glial fibrilar; EAAT1: Transportador de aminoácido excitatório 1; S100 β : Proteína β de ligação ao cálcio S100; DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol.*

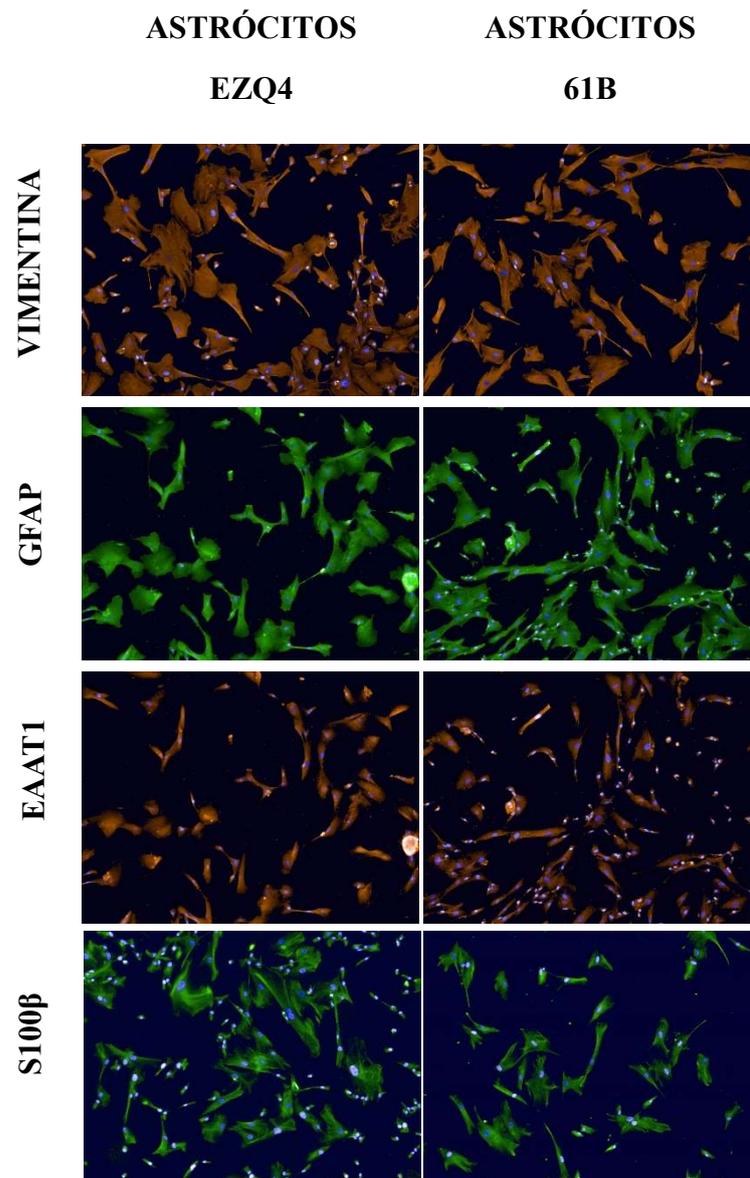


Figura 5 - Caracterização das linhagens de astrócitos derivados de esquizofrênicos (EZQ4 e 61B) com 5 semanas pós-diferenciação. Após o processo de diferenciação e amadurecimento terem sido concluídos, astrócitos de indivíduos esquizofrênicos foram caracterizados por imunofluorescência. Marcação dos Astrócitos EZQ4 (painéis da esquerda) e 61B (painéis da direita) para Vimentina, GFAP, EAAT1 e S100 β . *Imagens de microscopia de fluorescência. As marcações para as proteínas-alvo estão representadas nas cores verde ou laranja, enquanto o núcleo, marcado com DAPI, está em azul. GFAP: Proteína ácida glial fibrilar; EAAT1: Transportador de aminoácido excitatório 1; S100 β : Proteína β de ligação ao cálcio S100; DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol.*

5.2. Astrócitos de pacientes esquizofrênicos apresentam níveis alterados do mRNA de citocinas quando comparado aos controles

Os astrócitos derivados de indivíduos saudáveis e de pacientes esquizofrênicos (daqui em diante referidos simplesmente como astrócitos HC e SCZ, respectivamente) com no mínimo 5 semanas pós-diferenciação foram estimulados por 1,5; 3; 4,5; 6 e 24 h com TNF- α e os níveis de transcrito do próprio TNF- α e da IL-1 β foram mensurados por PCR quantitativa seguinte à transcrição reversa (RT-qPCR) do RNA mensageiro (mRNA). Como pode ser observado na **Figura 6A**, os níveis de TNF- α aumentaram tanto em astrócitos HC quanto em astrócitos SCZ, atingindo o ápice em 1,5 h após a estimulação com TNF- α e reduzindo gradativamente a partir disso. É interessante notar que os níveis deste transcrito se mostraram ligeiramente superiores nos astrócitos SCZ em todos os períodos de estimulação analisados, comparados àqueles observados nos astrócitos HC.

Por sua vez, os níveis de IL-1 β também se elevaram após o estímulo com TNF- α a partir de 1,5 até 24 h, quando comparado às células não estimuladas, atingindo o pico entre os tempos de 4,5 e 6 h do estímulo (**Figura 6B**). Notavelmente, os níveis deste transcrito aumentaram de forma menos robusta nos astrócitos SCZ do que no caso dos astrócitos HC em todos os tempos de estimulação analisados.

Tendo em vista o papel do TGF- β 3 em promover a produção de C1q por neurônios em camundongos (Bialas & Stevens, 2013), decidiu-se analisar o nível de expressão da isoforma correspondente em humanos diante do mesmo estímulo com TNF- α . Após realizar o alinhamento do mRNA de TGF- β 3 murino no banco de dados de referência para transcritos humanos, identificou-se a isoforma TGF- β 3 humana como correspondente àquela murina (valor E = 0; identidade = 82%; cobertura = 99%). Interessantemente, os resultados de RT-qPCR indicaram que os níveis de mRNA de TGF- β 3 basais (não-estimulado) são maiores nos astrócitos SCZ do que em astrócitos HC (**Figura 6C**). Após a estimulação com TNF- α , observa-se que os níveis de TGF- β 3 são reduzidos a aproximadamente a metade nos astrócitos SCZ em todos períodos analisados. Contudo, este mesmo padrão não é evidenciado nos astrócitos HC, onde a estimulação com TNF- α não alterou de forma robusta os níveis de mRNA de TGF- β 3 em nenhum dos períodos analisados.

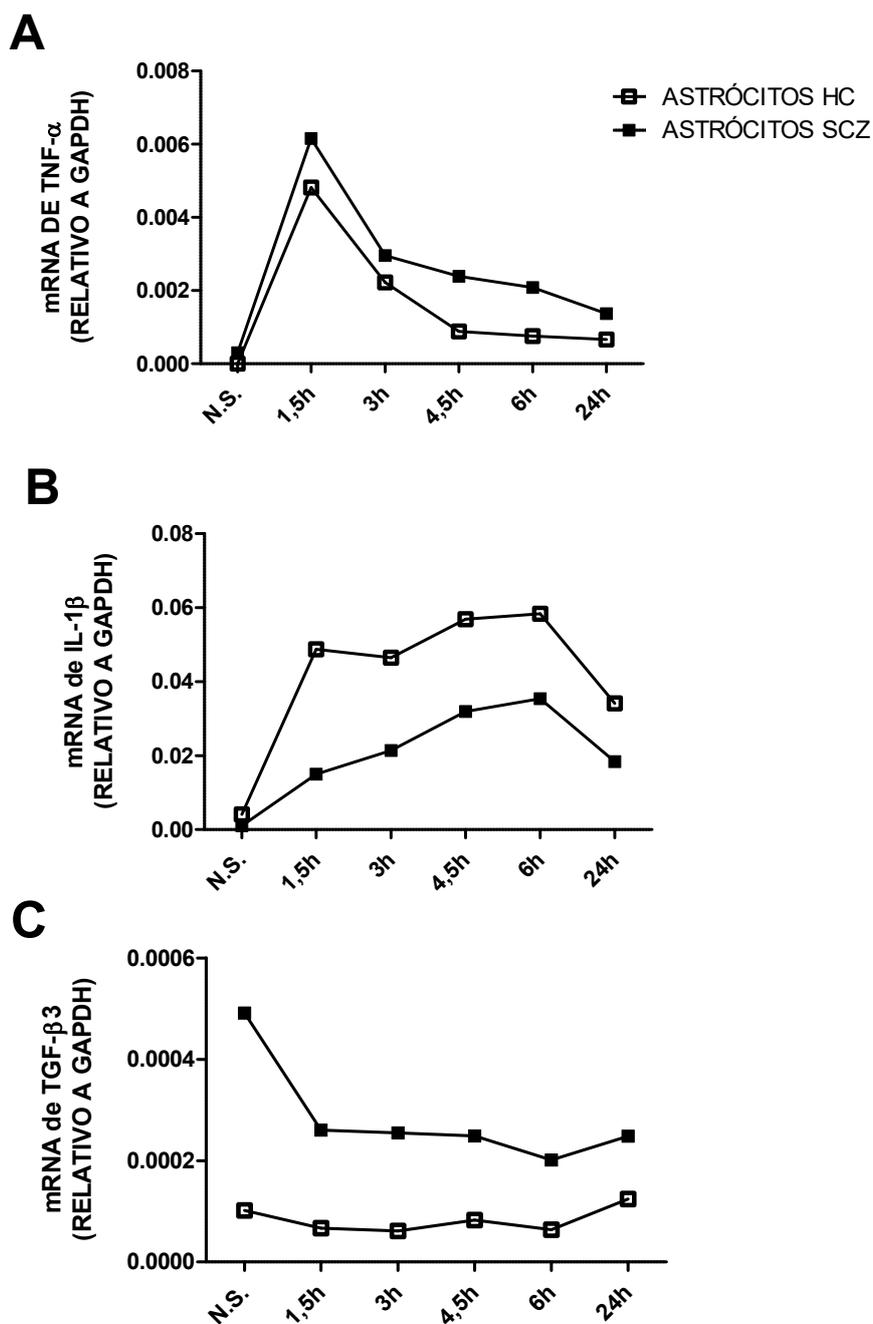


Figura 6 - Expressão de TNF- α , IL-1 β e TGF- β 3 em astrócitos HC e SCZ estimulados com 10 ng/mL de TNF- α . Os gráficos mostram os níveis de mRNA de TNF- α (A), IL-1 β (B) e TGF- β 3 (C) determinados por RT-qPCR. As amostras de RNA foram extraídas de astrócitos de indivíduos controle (quadrados abertos) e esquizofrênicos (quadrados preenchidos), estimulados com 10 ng/mL de TNF- α por 1,5, 3, 4,5, 6 e 24 h. A reação de RT-qPCR foi realizada em triplicata e normalizada pelos níveis de mRNA do GAPDH. N.S.: Não estimulado. Barra de erro omitida devido ao número de amostras restrito ($N = 2$).

5.3. Astrócitos de indivíduos esquizofrênicos apresentam cinética de expressão alterada do mRNA de CX3CL1

Além da análise da expressão das referidas citocinas, o cDNA dos astrócitos HC e SCZ estimulados com TNF- α por 1,5 a 24 h foi submetido à qPCR para

averiguar a cinética de expressão da quimiocina CX3CL1 (também conhecida como fractalquina). Evidencia-se que em todas as linhagens analisadas há aumento na produção do mRNA de CX3CL1 em todos os tempos do estímulo, quando comparado às células não estimuladas (**Figura 7**).

De modo interessante, nota-se que a cinética de expressão de CX3CL1 durante a estimulação nos astrócitos SCZ é atrasada quando comparada àquela observada para os astrócitos HC estimulados. De fato, os níveis deste transcrito atingem o pico com 3 h nos astrócitos de indivíduos controles, mantendo-se estáveis no período de 4,5 h e decaindo nos tempos subsequentes. Por sua vez, os níveis de mRNA de CX3CL1 observados em astrócitos SCZ atingem o máximo no período de 4,5 h, apresentando redução apenas a partir do tempo de 6 h (**Figura 7**).

Além disso, é possível observar que ao fim da estimulação com TNF- α (tempo de 24 h) os níveis de CX3CL1 encontram-se aumentados em astrócitos SCZ em relação àqueles dos astrócitos HC. Quando tomados em conjunto, estes dados indicam que as alterações no perfil de transcrição de CX3CL1 podem afetar a maneira como esta proteína é produzida em astrócitos derivados de pacientes esquizofrênicos durante a estimulação com TNF- α .

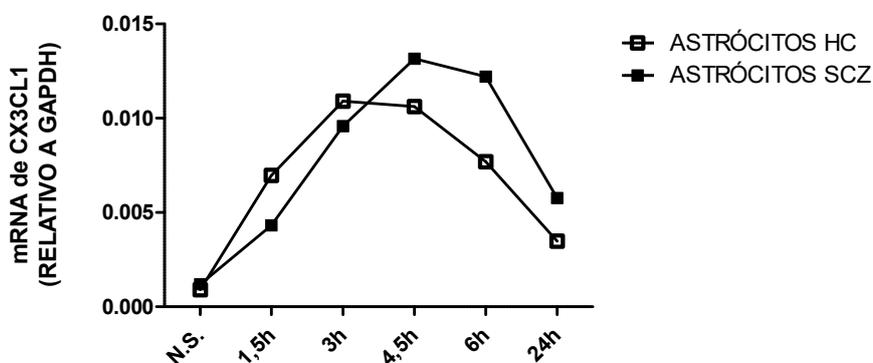


Figura 7 - Expressão de CX3CL1 em astrócitos HC e SCZ estimulados com 10 ng/mL de TNF- α . Os gráficos mostram os níveis de mRNA de CX3CL1 determinados por RT-qPCR. As amostras de RNA foram extraídas de astrócitos de indivíduos controle (quadrados abertos) e esquizofrênicos (quadrados preenchidos), estimulados com 10 ng/mL de TNF- α por 1,5, 3, 4,5, 6 e 24 h. A reação de RT-qPCR foi realizada em triplicata e normalizada pelos níveis de RNA do GAPDH. *N.S.*: Não estimulado. Barra de erro omitida devido ao número de amostras restrito ($N = 2$).

5.4. Astrócitos de pacientes esquizofrênicos estimulados com TNF- α apresentam níveis alterados da forma não secretada de CX3CL1

Após verificar que a cinética de expressão do mRNA de CX3CL1 estava alterada em astrócitos de indivíduos esquizofrênicos estimulados com TNF- α em relação ao observado para indivíduos controles, decidiu-se analisar a expressão proteica de CX3CL1 nos astrócitos submetidos ao mesmo estímulo pelos tempos de 6, 24 e 48 h. Especificamente, analisou-se apenas a forma não secretada de CX3CL1, ou seja, que ainda não foi clivada pela ação das metaloproteases ADAM10 e ADAM17 (Wolf *et al*, 2013). Findado o tempo de estimulação, as proteínas totais foram extraídas e as amostras submetidas à técnica de *Western Blot*.

Como mostrado na **Figura 8**, nota-se que a forma não secretada de CX3CL1 encontra-se expressa em maior quantidade nos extratos celulares de astrócitos derivados de indivíduos esquizofrênicos em todos os períodos analisados, quando comparados aos astrócitos HC. Interessantemente, quando se analisa o par de astrócitos das linhagens CF2 x EZQ4, não é possível observar a presença da forma não secretada na linhagem HC face ao estímulo com TNF- α . Por sua vez, os níveis desta proteína na linhagem derivada de pacientes esquizofrênicos aumentam ligeiramente até o tempo de 24 h após o estímulo, reduzindo a níveis basais no tempo de 48 h (**Figura 8A**).

Quando se analisa o par de linhagens 79A x 61B, verifica-se que, após a estimulação, há redução nos níveis de CX3CL1 não secretada nos astrócitos da linhagem 79A a partir do tempo de 6 h, o que permanece até o último tempo analisado (48 h). Em relação à linhagem 61B (astrócitos SCZ), observa-se que os níveis desta proteína não se alteram robustamente em face ao estímulo com TNF- α em nenhum dos tempos analisados (**Figura 8B**).

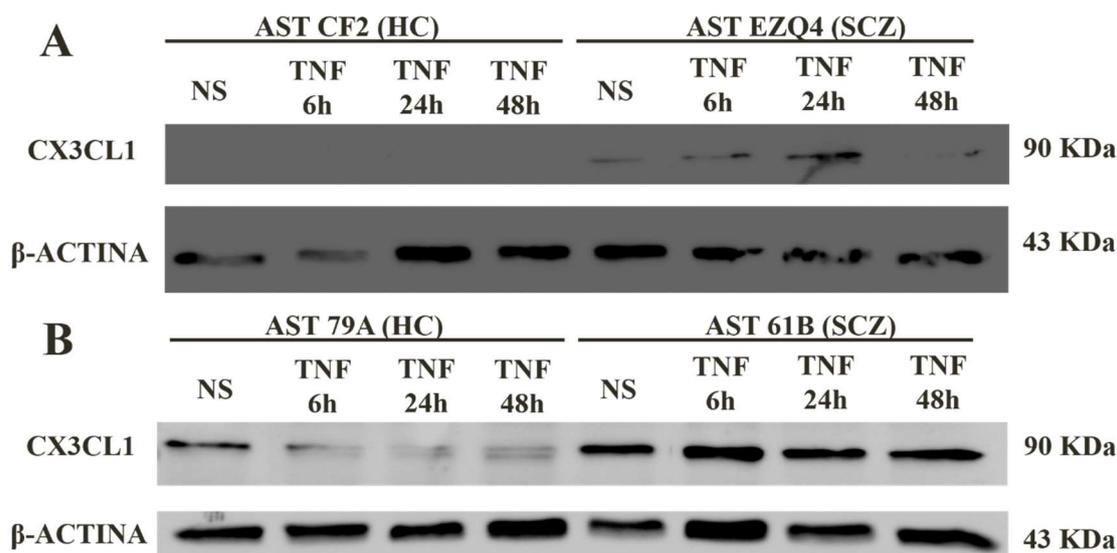


Figura 8 - Expressão da forma não secretada de CX3CL1 em astrócitos HC e SCZ estimulados com 10 ng/mL de TNF- α . São mostradas imagens de imunoblot para a CX3CL1 presente em astrócitos de indivíduos controle (HC: AST CF2 (A) e AST 79A (B)) e esquizofrênicos (SCZ: AST EZQ4 (A), AST 61B (B)) que foram estimulados com 10 ng/mL de TNF- α 6h, 24h e 48h. NS: Não estimulado; AST: astrócitos.

5.5. Células micróglia-like induzidas foram geradas de forma bem-sucedida a partir de PBMCs de indivíduos saudáveis

Notavelmente, existe uma extensa comunicação entre microglia e astrócitos em situações patológicas através de moléculas secretadas no SNC (Liu *et al*, 2011). Além disso, tanto astrócitos quanto microglias participam de forma ativa promovendo a poda sináptica em condições fisiológicas durante o desenvolvimento através da expressão de imunomoduladores (Schafer *et al*, 2012; Bialas & Stevens, 2013). Adicionalmente, astrócitos reativos do tipo A1, ativados por microglia, produzem níveis elevados de C3 (Liddelow *et al*, 2017). Deste modo, seria interessante investigar a produção de citocinas e fatores do complemento em microglias de indivíduos saudáveis e esquizofrênicos expostas ao meio condicionado de astrócitos HC e SCZ estimulados com TNF- α . Para tal, o protocolo desenvolvido por Ohgidani e colaboradores (2014) e modificado posteriormente por Sellgren e colegas (2016) mostra-se adequado, visto que células micróglia-like humanas podem ser produzidas em um curto período (entre 10-14 dias) a partir de PBMCs e apresentam fenótipo mais próximo àquele de micróglias humanas de origem fetal do que de macrófagos e de outras células do sistema imunológico (SELLGREN *et al*, 2016).

Deste modo, o sangue de três indivíduos saudáveis foi coletado, as PBMCs purificadas e submetidas ao protocolo de diferenciação para a produção de células

microglia-like induzidas (iMGs). Como pode ser observado na **Figura 9**, ao fim da diferenciação (12 dias), estas células apresentam morfologia ramificada, além de serem positivas para o fator de transcrição mielóide PU.1, para o marcador clássico de microglia IBA1 e para o receptor de fractalquina (CX3CR1) que é altamente expresso em micróglia (**Figura 10**).

Estes dados corroboram dados obtidos na literatura indicando que este protocolo é capaz de gerar, de forma bem-sucedida, iMGs a partir de PBMCs, podendo ser utilizadas em estudos posteriores para averiguar a interação existente entre microglia e outras células do sistema nervoso.

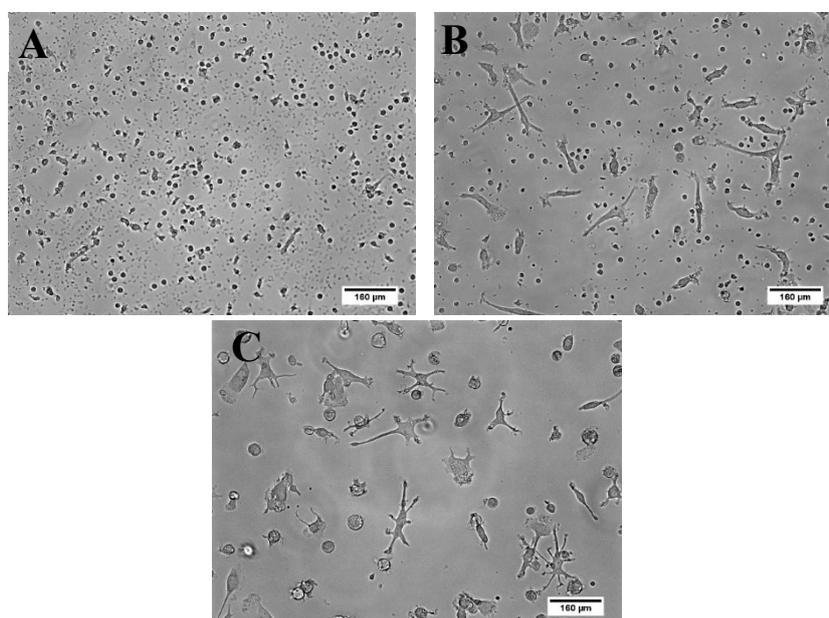


Figura 9 - Diferenciação de células microglia-like induzidas (iMGs) a partir de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) de indivíduos saudáveis. São mostradas imagens de microscopia de campo claro de células diferenciadas a partir das PBMCs obtidas a partir do sangue de três indivíduos saudáveis. (A) Imagem de células no 1º dia de diferenciação; (B) imagem de células no 5º dia de diferenciação) e (C) imagem de células microglia-like no 12º dia de diferenciação. *Barra de escala igual a 160 µm.*

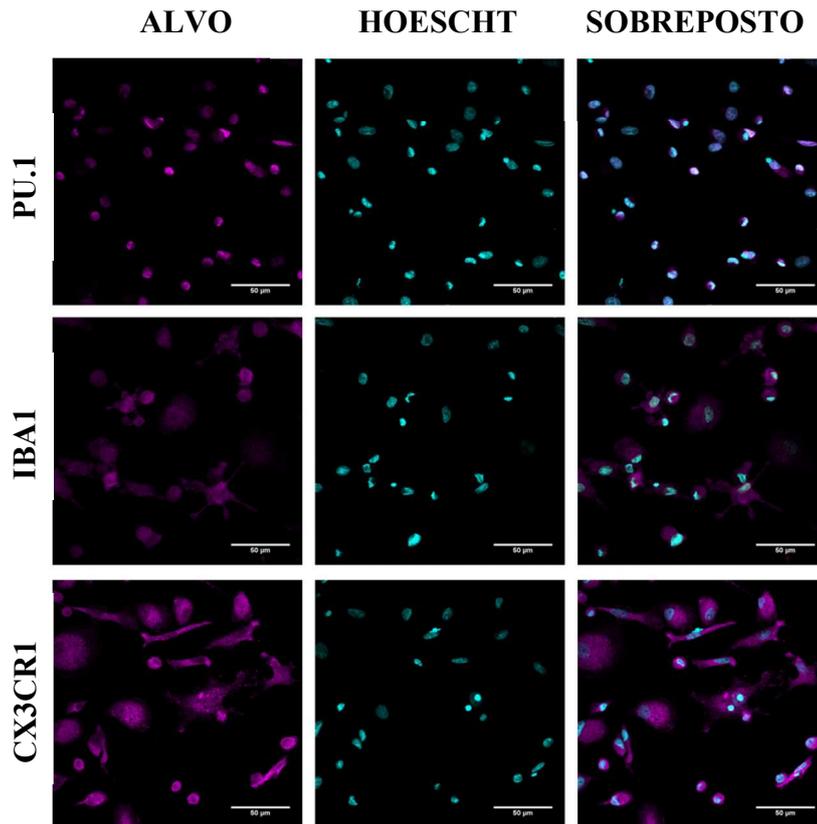


Figura 10 - Caracterização de iMGs para PU.1, IBA1 e CX3CR1 por imunofluorescência. São mostradas imagens de células microglia-like, após 12 dias de diferenciação, marcadas para PU.1, IBA1 e CX3CR1. *Imagens de microscopia de fluorescência. As marcações para as proteínas-alvo estão representadas em magenta, enquanto o núcleo, marcado com Hoescht, está em ciano. IBA1: Molécula adaptadora de ligação ao cálcio ionizado 1; CX3CR1: Receptor de CX3CL1.*

6. DISCUSSÃO

Os resultados deste trabalho indicam que duas linhagens astrocitárias de pacientes diagnosticados com esquizofrenia apresentam uma cinética de expressão do mRNA de TNF- α , IL-1 β , TGF- β 3 e CX3CL1 alteradas em relação aos astrócitos de indivíduos controles analisados. Além disso, é possível evidenciar uma alteração na expressão de CX3CL1 nos lisados dos astrócitos SCZ em relação àqueles dos indivíduos saudáveis. Ainda, os dados gerados neste estudo mostram que a utilização de iMGs derivadas de PBMCs do sangue de indivíduos saudáveis constitui um interessante modelo de estudo para a análise do papel da microglia em doenças neurológicas.

Embora ainda preliminares, os dados aqui reportados podem ajudar a explicar alguns aspectos observados na esquizofrenia. Deste modo, a literatura científica reporta que os imunomoduladores averiguados neste trabalho apresentam atividade biológica relevante nos principais tipos celulares encontrados no sistema nervoso central. Diante disso, a alteração de sua expressão em astrócitos, o tipo celular mais abundante no SNC (CHUNG *et al*, 2015), pode promover alterações significativas no cérebro de pacientes esquizofrênicos.

Neste sentido, Yang *et al* (2013) realizaram um estudo no qual foi demonstrado que, em camundongos modelos para encefalomielite autoimune experimental, elevações nos níveis periféricos de TNF- α promoviam elevações no processo de *turnover* sináptico no córtex somatossensorial. Nestes animais, as taxas de formação e eliminação de sinapses apresentaram-se aumentadas, o que foi revertido em animais tratados periféricamente com o dominante negativo para esta proteína. Interessantemente, foi reportado anteriormente que indivíduos esquizofrênicos apresentam níveis séricos elevados de TNF- α (WATANABE *et al*, 2010; FINEBERG & ELLMAN, 2013; RODRIGUES-AMORIM *et al*, 2017). Deste modo, os níveis elevados desta citocina no soro de esquizofrênicos poderiam recapitular parcialmente o fenótipo observado para os animais supracitados, levando ao aumento nos níveis de eliminação de sinapses. Além disso, os níveis periféricos de TNF- α poderiam induzir a expressão do transcrito desta mesma citocina em astrócitos no SNC, como observado neste trabalho, gerando um *feedback* positivo e exacerbando ainda mais as taxas de eliminação das sinapses. A este dado, agrega-se o fato de que TNF- α promove o aumento da expressão de MHC classe I em neurônios do SNC (NEUMANN *et al*, 1997), cuja atuação na poda sináptica já foi

demonstrada anteriormente (HUH *et al*, 2000). Assim, esses dados da literatura deixam claro que o estímulo utilizado nesse trabalho (TNF- α) é de grande relevância para a esquizofrenia e a poda sináptica.

Ademais, é possível que os astrócitos de esquizofrênicos apresentem um fenótipo reativo mais neurotóxico (tipo A1) quando comparado aos astrócitos de indivíduos controles quando submetidos ao estímulo com TNF- α . Tomando como base os achados obtidos por Liddelow e colegas (2017), microglias ativadas com LPS liberam para o meio extracelular TNF- α , IL-1 α e C1q, tornando astrócitos *naive* reativos, apresentando fenótipo do tipo A1. Alternativamente, astrócitos *naive* estimulados com IL-1 β apresentam fenótipo reativo do tipo A2, que é mais neuroprotetor (ZAMANIAN *et al*, 2012; LIDDELOW *et al*, 2017). No presente trabalho, observou-se que astrócitos derivados de pessoas esquizofrênicas produzem níveis maiores de TNF- α e menores de IL-1 β do que aqueles derivados de indivíduos saudáveis diante de estímulo inflamatório. Embora estes dados devam ser confirmados a nível proteico, pode-se sugerir que os astrócitos SCZ sejam menos capazes de promover um fenótipo neuroprotetor, favorecendo o surgimento de astrócitos do tipo A1. Visto que os astrócitos podem propagar estímulos inflamatórios locais para distâncias maiores (LIU *et al*, 2011), os astrócitos de esquizofrênicos poderiam atuar amplificando o fenótipo do tipo A1 de forma parácrina. Para tal, seria interessante analisar se astrócitos de indivíduos esquizofrênicos produzem níveis aumentados de IL-1 α , que, junto aos níveis elevados de TNF- α , atuariam em conjunto reforçando o fenótipo reativo do tipo A1. Contudo, para confirmar tal hipótese faz-se necessária a análise dos painéis de marcadores para astrócitos reativos, conforme descrito por Liddelow e colegas (2017), bem como se os níveis de C3 encontram-se aumentados em esquizofrênicos, uma característica marcante de astrócitos do tipo A1 e que encontra paralelos nos mecanismos inerentes à poda sináptica.

Além disso, os astrócitos de indivíduos esquizofrênicos poderiam atuar “primando” de forma mais consistente as microglias destes pacientes. O principal mecanismo pelo qual uma microglia torna-se primada envolve a exposição inicial a estímulos inflamatórios. Quando isso ocorre, as microglias tornam-se sensibilizadas e em face a um segundo estímulo inflamatório respondem de forma ainda mais intensa quando comparada ao primeiro (PERRY *et al*, 2014). Deste modo, caso os astrócitos de esquizofrênicos apresentem um fenótipo do tipo A1 mais robusto quando comparado aos astrócitos de pessoas saudáveis, eles poderiam atuar liberando um conjunto maior de

imunomoduladores (incluindo o próprio TNF- α), capazes de primar de forma mais consistente as microglias. Entretanto, o tamanho amostral não permitiu conclusões definitivas e mais experimentos são necessários objetivando investigar se os astrócitos de pacientes esquizofrênicos realmente apresentam um perfil reativo do tipo A1. Se assim o for, este mecanismo ajudaria a explicar e corroborar a hipótese de que a esquizofrenia é uma doença desencadeada pela conjugação dos fatores genéticos associados a dois estímulos estressores que ocorrem durante a vida do indivíduo (MÜLLER *et al*, 2015). Neste sentido, seria interessante averiguar se o meio condicionado de astrócitos de indivíduos esquizofrênicos é capaz de sensibilizar diferencialmente tanto as microglias de pessoas saudáveis ou com a doença. Logo, o modelo de produção de células microglia-*like* a partir de PBMCs desenvolvido neste trabalho torna-se muito atrativo para realizar este tipo de investigação, o que deverá ser feito futuramente. Ohgidani e colaboradores (2014) mostraram no seu trabalho não apenas que as iMGs possuíam características morfológicas similares às microglias, mas também que apresentavam capacidade fagocítica e marcadores moleculares pertinentes a este tipo celular e que a distanciavam dos monócitos das quais eram derivadas. Posteriormente, Sellgren *et al* (2016) não apenas refinaram o método, mas também mostraram, através de análises do transcriptoma, que as iMGs possuíam perfil de expressão gênico próximo àquele das microglias fetais e, em menor escala, das adultas, distanciando-se das características encontradas em outras células do sistema imunológico, como macrófagos.

Os resultados desse estudo indicam ainda que a maioria dos astrócitos derivados de pacientes esquizofrênicos apresenta níveis basais mais elevados de TGF- β 3. Esta citocina tem seu envolvimento nos processos de poda sináptica comprovados, visto que ela sinaliza através dos receptores TGF- β RI e TGF- β RII na superfície de neurônios induzindo a expressão C1q (BIALAS & STEVENS, 2013). Assim, caso este dado confirme-se a nível proteico, poder-se-ia especular que em esquizofrênico a via clássica do complemento estaria mais ativa nas sinapses, o que poderia levar a uma ocorrência maior de poda sináptica. Embora pouco se saiba sobre o papel regulatório de TGF- β 3 no sistema imunológico (TGF- β 1 é a principal isoforma relevante no sistema imune), é possível que esta citocina também desempenhe papel tanto inflamatório quanto anti-inflamatório, haja visto o papel dual que TGF- β possui no sistema imune (OKAMURA *et al*, 2015). Assim, seria interessante averiguar o efeito que TGF- β 3 poderia induzir nas microglias, as células do sistema imunológico no cérebro.

Além disso, astrócitos são capazes de modular a atividade de microglia (LIU *et al*, 2011). Neste sentido, destaca-se o envolvimento de CX3CL1, cujo receptor no SNC encontra-se localizado apenas na membrana de microglias. CX3CL1 é produzida como uma proteína transmembrana e que pode ser liberada na forma secretada pela ação das metaloproteases ADAM10 e ADAM17, sendo que esta segunda atua especialmente durante processos inflamatórios (GARTON *et al*, 2001; WOLF *et al*, 2013). É interessante notar que, embora ambas formas de CX3CL1 atuem através de seu domínio quimiotático, a resposta gerada por sua ligação na membrana pode ser distinta (WOLF *et al*, 2013). Morganti *et al* (2012), por exemplo, mostraram que a forma secretada de CX3CL1 é capaz de mediar funções neuroprotetoras em um modelo murino na Doença de Parkinson, o que não ocorre no caso da forma ligada à membrana (ROGERS *et al*, 2011). Os dados gerados neste trabalho mostram que os astrócitos SCZ não apenas possuem uma cinética de transcrição de CX3CL1 atrasada, mas também níveis aumentados da forma não secretada desta proteína. Estes dois fenômenos sugerem que a regulação da produção de CX3CL1 em astrócitos de indivíduos esquizofrênicos pode estar alterada quando comparado àquela de indivíduos controles.

No que tange os níveis aumentados da forma não secretada em astrócitos de esquizofrênicos, três hipóteses principais, que devem ser investigadas em estudos posteriores, podem ser levantadas. A forma não secretada de CX3CL1 pode estar sendo retida no complexo de Golgi de astrócitos SCZ quando da estimulação com TNF- α . Neste sentido, Fuster-Matanzo *et al* (2017) mostraram recentemente que a inibição de GSK-3 β na cultura de neurônios hipocâmpais murinos altera o tráfego da forma madura de CX3CL1 do complexo de Golgi para a membrana plasmática, retendo-a nesta organela. Notavelmente, estudos anteriores mostraram que os níveis do mRNA de GSK-3 β apresentam redução de 40% no córtex pré-frontal dorsolateral de pacientes esquizofrênicos (KOZLOVSKY *et al*, 2005). Além disso, a via de ativação desta quinase (AKT1/GSK-3 β) é defeituosa em esquizofrênicos, reduzindo a fosforilação de sua Ser9. Interessantemente, os autores deste estudo mostraram que a administração de haloperidol, um fármaco comumente utilizado no tratamento da esquizofrenia, promove a fosforilação desta serina por Akt1, ativando GSK-3 β (EMAMIAN *et al*, 2004). Logo, alterações nesta via de sinalização nos astrócitos de indivíduos esquizofrênicos poderiam ajudar a explicar o aumento dos níveis da forma não secretada de CX3CL1. Outra hipótese interessante para explicar tal evento envolveria um aumento na endocitose da forma ligada à

membrana de CX3CL1. Huang *et al* (2009) mostraram em seu trabalho que a CX3CL1 sofre endocitose da forma ligada à membrana de forma constitutiva, prevenindo sua clivagem pela ação de metaloproteases. Assim, seria interessante investigar se em astrócitos obtidos a partir de pacientes esquizofrênicos há uma exacerbação da endocitose da forma de membrana, promovendo seu acúmulo no interior do citoplasma dos astrócitos. Além disso, uma alteração na liberação da forma secretada em astrócitos derivado de esquizofrênicos poderia ser explicada por alterações na atividade das enzimas envolvidas no processo de clivagem ou ainda mutações que modifiquem os sítios de clivagem desta quimiocina. Embora a forma ligada à membrana de CX3CL1 seja frequentemente associada com a manutenção de microglias no seu estado de vigilância (WOLF *et al*, 2013), a retenção desta forma na membrana de astrócitos derivados de esquizofrênicos poderia atuar reduzindo sua migração durante o período no qual a poda sináptica é mais ativa, impedindo que esta ocorra de forma adequada. Diante disso, estudos posteriores visando a análise dos níveis da proteína CX3CL1 no sobrenadante dos astrócitos faz-se necessários para ajudar a distinguir entre estas três hipóteses. Embora não seja possível discerni-las neste trabalho, os resultados indicam que a via de sinalização envolvendo CX3CL1/CX3CR1 possivelmente está alterada no que tange à comunicação entre astrócitos/microglia.

Apesar dos dados encontrados neste estudo poderem fornecer indícios importantes sobre a fisiopatologia da esquizofrenia, algumas ressalvas devem ser feitas e os resultados em questão vistos com cautela. Primeiramente, o modelo utilizado neste estudo permite apenas a análise de um tipo celular, excluindo a interação dos astrócitos com as outras células encontradas no cérebro. Em segundo lugar, o tamanho amostral deve ser aumentado, visto que apenas dois pares de indivíduos saudáveis x esquizofrênicos foram analisados. Além disso, uma pequena discrepância na produção da forma celular de CX3CL1 foi observada entre linhagens pertencentes ao mesmo grupo experimental, o que pode ser explicado com base na heterogeneidade existente entre esquizofrênicos e no fato de que, diferentemente de animais isogênicos, cada linhagem provém de um doador com características genéticas distintas (BRENNAND *et al*, 2013).

7. CONCLUSÃO

Neste estudo, astrócitos derivados de hIPSCs de indivíduos saudáveis e pacientes esquizofrênicos foram utilizados com o intuito de modelar o efeito que a sinalização inflamatória, similar àquela que ocorre na infecção pré-natal, tem sobre a transcrição de citocinas e quimiocina relevantes na modulação da poda sináptica, um evento cujo ápice ocorre durante a adolescência. Além disso, com o intuito de averiguar a comunicação existente entre tais astrócitos e microglias, reproduziu-se um protocolo no qual se pode gerar com sucesso células *microglia-like* a partir de PBMCs derivado do sangue de indivíduos saudáveis.

Embora os dados deste trabalho sejam preliminares em virtude do tamanho da amostra analisada, os resultados aqui apresentados fornecem alguns indícios importantes. Primeiramente, a cinética de indução do mRNA de TNF- α e IL-1 β parecem ser distintas nos astrócitos derivados de pacientes esquizofrênicos estimulados com o próprio TNF- α , o que pode indicar que tais astrócitos apresentam um fenótipo reativo do tipo A1 mais pronunciado quando comparado àquele dos astrócitos de indivíduos controles. Em segundo lugar, os níveis do transcrito de TGF- β 3 podem estar aumentados em nível basal em esquizofrênicos, podendo modular positivamente os níveis de C1q nos neurônios destes indivíduos. Finalmente, a cinética de expressão de CX3CL1 não apenas parece ser mais atrasada em esquizofrênicos, como os astrócitos de tais indivíduos apresentam níveis mais elevados da forma celular desta quimiocina, sugerindo problemas na liberação da forma secretada. Este último fenômeno pode ocorrer devido a sua retenção no complexo de Golgi, endocitose excessiva da membrana plasmática ou ainda problemas na clivagem de CX3CL1 ligada à membrana.

Estes dados necessitam ser validados tanto pelo aumento do tamanho da amostra, quanto por análises dos níveis proteicos destes imunomoduladores. Contudo, estes primeiros indícios fornecem perspectivas interessantes no que tange à modulação de moléculas do sistema imunológico por astrócitos de pacientes com esquizofrenia, podendo fornecer importantes respostas em relação aos mecanismos alterados durante o advento da poda sináptica nas pessoas com tal desordem.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAKHSHI, K.; CHANCE, S.a. The neuropathology of schizophrenia: A selective review of past studies and emerging themes in brain structure and cytoarchitecture. *Neuroscience*, v. 303, p. 82–102, 2015. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0306452215005692>>.

BERGEN, S E *et al.* Genome-wide association study in a Swedish population yields support for greater CNV and MHC involvement in schizophrenia compared with bipolar disorder. n. December 2011, p. 880–886, 2012.

BERGON, Aurélie *et al.* CX3CR1 is dysregulated in blood and brain from schizophrenia patients. *Schizophrenia Research*, v. 168, n. 1–2, p. 434–443, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.schres.2015.08.010>>.

BIALAS, Allison R.; STEVENS, Beth. TGF- β signaling regulates neuronal C1q expression and developmental synaptic refinement. *Nature Neuroscience*, v. 16, n. 12, p. 1773–1782, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nn.3560>>.

BJARTMAR, L. *et al.* Neuronal Pentraxins Mediate Synaptic Refinement in the Developing Visual System. *Journal of Neuroscience*, v. 26, n. 23, p. 6269–6281, 2006. Disponível em: <<http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.4212-05.2006>>.

BOKSA, Patricia. Abnormal synaptic pruning in schizophrenia: Urban myth or reality? *Journal of Psychiatry and Neuroscience*, v. 37, n. 2, p. 75–77, 2012.

BRENNAND, K.J.; GAGE, F.H. Concise Review: The Promise of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Based Studies of Schizophrenia. *Stem Cells*, v. 29, p. 1915–1922, 2011.

BRENNAND, Kristen J; LANDEK-SALGADO, Melissa A; SAWA, Akira. Modeling Heterogeneous Patients with a Clinical. *Biological Psychiatry*, p. 1–9, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biopsych.2013.10.025>>.

BROWN, Alan S. Prenatal Infection as a Risk Factor for Schizophrenia. v. 32, n. 2, p. 200–202, 2006.

CANETTA, S *et al.* Maternal immune activation leads to selective functional deficits in offspring parvalbumin interneurons. n. August 2015, p. 1–13, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/mp.2015.222>>.

CANNON, Tyrone D. How Schizophrenia Develops : Cognitive and Brain Mechanisms Underlying Onset of Psychosis. *Trends in Cognitive Sciences*, v. xx, n. 12, p. 1–13, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tics.2015.09.009>>.

CHUNG, Won Suk *et al.* Do glia drive synaptic and cognitive impairment in disease? *Nature Neuroscience*, v. 18, n. 11, p. 1539–1545, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nn.4142>>.

EMAMIAN, Effat S. *et al.* Convergent evidence for impaired AKT1-GSK3 β signaling in schizophrenia. *Nature Genetics*, v. 36, n. 2, p. 131–137, 2004.

FEINBERG, I. Schizophrenia: Caused by a fault in programmed synaptic elimination during adolescence? *Journal of Psychiatric Research*, v. 17, n. 4, p. 319–334, 1982.

FINEBERG, Anna M.; ELLMAN, Lauren M. Inflammatory cytokines and neurological and neurocognitive alterations in the course of schizophrenia. *Biological Psychiatry*, v. 73, n. 10, p. 951–966, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biopsych.2013.01.001>>.

FUSTER-MATANZO, Almudena *et al.* Glycogen synthase kinase-3 β regulates fractalkine production by altering its trafficking from Golgi to plasma membrane: implications for Alzheimer's disease. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 74, n. 6, p. 1153–1163, 2017.

GARTON, Kyle J. *et al.* Tumor Necrosis Factor- α -converting Enzyme (ADAM17) Mediates the Cleavage and Shedding of Fractalkine (CX3CL1). *Journal of Biological Chemistry*, v. 276, n. 41, p. 37993–38001, 2001.

GEJMAN, Pablo V.; SANDERS, Alan R.; KENDLER, Kenneth S. Genetics of Schizophrenia: New Findings and Challenges. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, v. 12, n. 1, p. 121–144, 2011. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-genom-082410-101459>>.

GLANTZ, Leisa A.; LEWIS, David A. Decreased Dendritic Spine Density on Prefrontal Cortical Pyramidal Neurons in Schizophrenia. *Archives of General Psychiatry*, v. 57, n.

1, p. 65, 2000. Disponível em: <<http://archpsyc.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/archpsyc.57.1.65>>.

HUANG, Yi-wei *et al.* Constitutive Endocytosis of the Chemokine CX3CL1 Prevents Its Degradation by Cell Surface Metalloproteases *. v. 284, n. 43, p. 29644–29653, 2009.

HUH, G S *et al.* Functional requirements for class I MHC in CNS development and plasticity. *Science*, v. 290, n. December, p. 2155–2159, 2000.

JACOBS, Benjamin Meir. A dangerous method? The use of induced pluripotent stem cells as a model for schizophrenia. *Schizophrenia Research*, p. 1–6, 2015. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0920996415003448>>.

KOZLOVSKY, Nitsan; NADRI, Carmit; AGAM, Galila. Low GSK-3 β in schizophrenia as a consequence of neurodevelopmental insult. *European Neuropsychopharmacology*, v. 15, n. 1, p. 1–11, 2005.

LASKARIS, L. E. *et al.* Microglial activation and progressive brain changes in schizophrenia. *British Journal of Pharmacology*, v. 173, n. 4, p. 666–680, 2016.

LEVITT, JAMES J. BOBROW, LAUREL LUCIA, DIANDRA SRINIVASAN, Padmapriya. A Selective Review of Volumetric and Morphometric Imaging in Schizophrenia. In: SWERDLOW, N. (Org.). *Behavioral Neurobiology of Schizophrenia and Its Treatment*. Berlin, Heidelberg: Springer, 2010. p. 243–281. Disponível em: <https://link.springer.com/chapter/10.1007/7854_2010_53#citeas>.

LEWIS, David A. Neuroplasticity of excitatory and inhibitory cortical circuits in schizophrenia. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, v. 11, n. 3, p. 269–280, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3075863/>>.

LIDDELOW, Shane A. *et al.* Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature*, v. 541, n. 7638, p. 481–487, 2017. Disponível em: <<http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nature21029>>.

LISMAN, John E. *et al.* Circuit-based framework for understanding neurotransmitter and risk gene interactions in schizophrenia. *Trends in Neurosciences*, v. 31, n. 5, p. 234–242, 2008. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166223608000891>>.

LIU, W.; TANG, Y.; FENG, J. Cross talk between activation of microglia and astrocytes in pathological conditions in the central nervous system. *Life Sciences*, v. 89, n. 5–6, p. 141–146, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2011.05.011>>.

MARANTO, Jeffrey; RAPPAPORT, Jay; DATTA, Prasun K. *Cellular Biochemistry*. v. 1175, n. January, p. 1168–1175, 2011.

MATTEI, D *et al.* Maternal immune activation results in complex microglial transcriptome signature in the adult offspring that is reversed by minocycline treatment. n. February, 2017.

MORENO, L *et al.* Maternal Influenza Viral Infection Causes Schizophrenia- Like Alterations of 5-HT 2A and mGlu 2 Receptors in the Adult. v. 31, n. 5, p. 1863–1872, 2011.

MORGANTI, J. M. *et al.* The Soluble Isoform of CX3CL1 Is Necessary for Neuroprotection in a Mouse Model of Parkinson’s Disease. *Journal of Neuroscience*, v. 32, n. 42, p. 14592–14601, 2012. Disponível em: <<http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.0539-12.2012>>.

MÜLLER, Norbert *et al.* The role of inflammation in schizophrenia. *Frontiers in Neuroscience*, v. 9, n. October, p. 1–9, 2015.

NEUMANN, By H *et al.* Major Histocompatibility Complex (MHC) Class I Gene Expression in Single Neurons of the Central Nervous System : Differential Regulation by. v. 185, n. 2, 1997.

NIMGAONKAR, V L *et al.* The complement system : a gateway to gene – environment interactions in schizophrenia pathogenesis. *Molecular Psychiatry*, n. September 2016, p. 1–8, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/mp.2017.151>>.

OHGIDANI, Masahiro *et al.* Direct induction of ramified microglia-like cells from human monocytes: Dynamic microglial dysfunction in Nasu-Hakola disease. *Scientific Reports*, v. 4, p. 1–7, 2014.

OKAMURA, Tomohisa *et al.* Role of TGF- β 3 in the regulation of immune responses. *Clinical and Experimental Rheumatology*, v. 33, p. 63–69, 2015.

PAOLICELLI, Rosa C. *et al.* Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science*, v. 333, n. 6048, p. 1456–1458, 2011.

PEREZ, Stephanie M; LODGE, Daniel J. New approaches to the management of schizophrenia: focus on aberrant hippocampal drive of dopamine pathways. *Drug design, development and therapy*, v. 8, p. 887–96, 2014. Disponível em: <<http://www.dovepress.com/new-approaches-to-the-management-of-schizophrenia-focus-on-aberrant-hi-peer-reviewed-fulltext-article-DDDT#ref56>>.

PERRY, V. Hugh; HOLMES, Clive. Microglial priming in neurodegenerative disease. *Nature Reviews Neurology*, v. 10, n. 4, p. 217–224, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrneurol.2014.38>>.

PICKERING, Mark; CUMISKEY, Derval; O'CONNOR, John J. Actions of TNF- α on glutamatergic synaptic transmission in the central nervous system. *Experimental Physiology*, v. 90, n. 5, p. 663–670, 2005.

RILEY, Brien; KENDLER, Kenneth S. Molecular genetic studies of schizophrenia. *European Journal of Human Genetics*, v. 14, n. 6, p. 669–680, 2006. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/finder/10.1038/sj.ejhg.5201571>>.

RODRIGUES-AMORIM, Daniela *et al.* Cytokines dysregulation in schizophrenia: A systematic review of psychoneuroimmune relationship. *Schizophrenia Research*, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.schres.2017.11.023>>.

ROGERS, J. T. *et al.* CX3CR1 Deficiency Leads to Impairment of Hippocampal Cognitive Function and Synaptic Plasticity. *Journal of Neuroscience*, v. 31, n. 45, p. 16241–16250, 2011. Disponível em: <<http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.3667-11.2011>>.

SAKURAI, Takeshi *et al.* Converging models of schizophrenia – Network alterations of prefrontal cortex underlying cognitive impairments. *Progress in Neurobiology*, v. 134, p. 178–201, 2015. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301008215000994>>.

SCHAFER, Dorothy P. *et al.* Microglia Sculpt Postnatal Neural Circuits in an Activity and Complement-Dependent Manner. *Neuron*, v. 74, n. 4, p. 691–705, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2012.03.026>>.

SCHAFER, Dorothy P; STEVENS, Beth. Synapse elimination during development and disease: immune molecules take centre stage. *Biochemical Society transactions*, v. 38, n. 2, p. 476–81, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20298206>>.

SCHNEIDER, H *et al.* A neuromodulatory role of interleukin-1beta in the hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 95, n. 13, p. 7778–83, 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9636227>%5Cn<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC22755>>.

SEKAR, Aswin *et al.* Schizophrenia risk from complex variation of complement component 4. *Nature*, v. 530, n. 7589, p. 177–183, 2016. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/nature16549>>.

SELLGREN, C. M. *et al.* Patient-specific models of microglia-mediated engulfment of synapses and neural progenitors. *Molecular Psychiatry*, v. 22, n. 2, p. 170–177, 2016.

SHATZ, C.; STRYKER, M. Prenatal tetrodotoxin infusion blocks segregation of retinogeniculate afferents. *Science*, v. 242, n. 4875, p. 87–89, 1988. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.3175636>>.

SIGURDSSON, T. Neural circuit dysfunction in schizophrenia: Insights from animal models. *Neuroscience*, n. July, 2015. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0306452215006004>>.

SOFRONIEW, Michael V.; VINTERS, Harry V. Astrocytes: Biology and pathology. *Acta Neuropathologica*, v. 119, n. 1, p. 7–35, 2010.

STELLWAGEN, David; MALENKA, Robert C. Synaptic scaling mediated by glial TNF- α . *Nature*, v. 440, n. 7087, p. 1054–1059, 2006.

STEVENS, Beth *et al.* The Classical Complement Cascade Mediates CNS Synapse Elimination. *Cell*, v. 131, n. 6, p. 1164–1178, 2007.

TAKEUCHI, T.; DUSZKIEWICZ, A. J.; MORRIS, R. G. M. The synaptic plasticity and memory hypothesis: encoding, storage and persistence. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 369, n. 1633, p. 20130288–20130288, 2013. Disponível em: <<http://rstb.royalsocietypublishing.org/cgi/doi/10.1098/rstb.2013.0288>>.

URANOVA, Natalya A. *et al.* Ultrastructural Alterations of Myelinated Fibers and Oligodendrocytes in the Prefrontal Cortex in Schizophrenia: A Postmortem Morphometric Study. *Schizophrenia Research and Treatment*, v. 2011, p. 1–13, 2011. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/schizort/2011/325789/>>.

WANG, Chenyao; ALEKSIC, Branko; OZAKI, Norio. Glia-related genes and their contribution to schizophrenia. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*, v. 69, p. 448–461, 2015. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/pcn.12290>>.

WATANABE, Yuichiro; SOMEYA, Toshiyuki; NAWA, Hiroyuki. Evidence from human studies and animal models. p. 217–230, 2010.

WINDREM, Martha S. *et al.* Human iPSC Glial Mouse Chimeras Reveal Glial Contributions to Schizophrenia. *Cell Stem Cell*, v. 21, n. 2, p. 195–208.e6, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2017.06.012>>.

WOLF, Yochai *et al.* Microglia, seen from the CX3CR1 angle. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, v. 7, n. March, p. 1–9, 2013. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fncel.2013.00026/abstract>>.

YAN, Yiping *et al.* Efficient and Rapid Derivation of Primitive Neural Stem Cells and Generation of Brain Subtype Neurons From Human Pluripotent Stem Cells. *STEM CELLS Translational Medicine*, v. 2, n. 11, p. 862–870, 2013. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.5966/sctm.2013-0080>>.

YANG, G. *et al.* Peripheral elevation of TNF- leads to early synaptic abnormalities in the mouse somatosensory cortex in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 110, n. 25, p. 10306–10311, 2013. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1222895110>>.

YANG, Xiang *et al.* BDNF polymorphisms are associated with schizophrenia onset and positive symptoms. *Schizophrenia Research*, p. 7–13, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.schres.2015.11.009>>.

YOSHIDA, Hidemi *et al.* Synergistic stimulation , by tumor necrosis factor- α and interferon- γ , of fractalkine expression in human astrocytes. v. 303, p. 132–136, 2001.

ZAMANIAN, J. L. *et al.* Genomic Analysis of Reactive Astroglia. *Journal of Neuroscience*, v. 32, n. 18, p. 6391–6410, 2012. Disponível em: <<http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.6221-11.2012>>.

ZHAN, Yang *et al.* Deficient neuron-microglia signaling results in impaired functional brain connectivity and social behavior. *Nature Neuroscience*, v. 17, n. 3, p. 400–406, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nn.3641>>.

ANEXOS

TABELA 1 – Dados dos voluntários e pacientes dos quais as linhagens celulares foram obtidas				
Linhagem Celular	Fenótipo	Idade	Sexo	Células parentais
CF2	Saudável	31	M	Fibroblastos da pele
79A	Saudável	36	F	Fibroblastos da pele
EZQ4	Esquizofrênico	44	M	Fibroblastos da pele
61B	Esquizofrênico	27	F	Fibroblastos da pele

TABELA 2 – Dados dos <i>primers</i> utilizados			
Gene	Número de acesso no Genbank (NCBI)	Orientação	Sequência (5' →3')
TNF- α	NM_000594.3	Senso	CTGCACTTTGGAGTGATCGG
		Antissenso	TGAGGGTTTGCTACAACATGGG
IL-1 β	NM_000576.2	Senso	CACGATGCACCTGTACGATCA
		Antissenso	GTTGCTCCATATCCTGTCCCT
TGF- β 3	NM_003239.4	Senso	CTTCCAGATCCTTCGGCCAG
		Antissenso	ATCAAAGGACAGCCACTCGG
CX3CL1	NM_002996.5	Senso	CGGTGTGACGAAATGCAACA
		Antissenso	CTCCAAGATGATTGCGCGTT
GAPDH	NM_002046.5	Senso	GCCCTCAACGACCACTTTG
		Antissenso	CCACCACCCTGTTGCTGTAG

HOSPITAL COPA DOR


PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: PESQUISA TRANSLACIONAL EM PSIQUIATRIA: INVESTIGAÇÃO DE MECANISMOS FISIOPATOLÓGICOS E NOVOS TRATAMENTOS PARA ESQUIZOFRENIA, TRANSTORNO OBSESSIVO-COMPULSIVO E TRANSTORNO DE DÉFICIT DE ATENÇÃO E HIPERATIVIDADE.

Pesquisador: Stevens Kastrup Rezon

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 323.85314.9.0000.5249

Instituição Proponente: INSTITUTO D'OR DE PESQUISA E ENSINO

Patrocinador Principal: Conselho Nacional de Desenvolvimento e Tecnologia
FUN CARLOS CHAGAS F. DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO - FAPERJ

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.163.558

Data da Relatoria: 28/07/2015


Apresentação do Projeto:

Trata-se de uma Emenda a Projeto de pesquisa já aprovado pelo CEP em 22 de Julho do ano de 2014 sob número 727.269. A proposta atual gera a versão 3 do projeto de pesquisa no Sistema Plataforma Brasil. Trata-se de pesquisa translacional cuja proposta é avançar no entendimento dos aspectos moleculares, celulares e metabólicos de transtornos mentais e do neuro-desenvolvimento, incluindo, especificamente, a esquizofrenia (distúrbio do neuro-desenvolvimento que acomete 1% da população mundial, abrangendo sintomas cognitivos, como déficits na atenção, memória ou planejamento), o transtorno obsessivo-compulsivo – TOC (um transtorno caracterizado por pensamentos obsessivos e compulsivos no qual o indivíduo tem comportamentos considerados estranhos para a sociedade ou para a própria pessoa) e o transtorno do déficit de atenção e hiperatividade – TDAH, (caracterizado por desatenção, inquietude e impulsividade), todos através do uso de células-tronco de pluripotência induzida.

Os autores do projeto informam que as células de pluripotência induzida (iPS) serão reprogramadas a partir de fibroblastos e células epiteliais do aparelho urinário de pacientes com

Endereço: Rua Figueiredo Magalhães, 875
Bairro: Copacabana **CEP:** 22.031-010
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)2545-3782 **Fax:** (21)2546-8610 **E-mail:** oecopador@copador.com.br

HOSPITAL COPA DOR



Continuação do Parecer: 1.188.558

esquizofrenia, TOC e TDAH e análises por diferentes abordagens experimentais em voluntários saudáveis.

A partir deste modelo, a hipótese central baseia-se na possibilidade de aprimoramento do conhecimento sobre as condições supra citadas, através da descrição de alterações moleculares, celulares, metabólicas e de expressão gênica observadas durante o processo de desenvolvimento neuronal in vitro, a partir de células-tronco de pluripotência induzida de pacientes com transtornos mentais, comparados aos mesmos tipos celulares de voluntários saudáveis.

Os autores informam a limitação no desenvolvimento de estudos dessa natureza devido às dificuldades da obtenção de amostras de células vivas do sistema nervoso central, principalmente na fase inicial dessas doenças e nesse sentido apontam a reprogramação de fibroblastos humanos adultos em células com o fenótipo e potencial de diferenciação comparável ao de células-tronco embrionárias, o que permitirá o desenvolvimento de novos estudos nesse campo.

Apontam também que por serem geneticamente idênticas às células do doador e capazes de gerar todos os tipos celulares de um indivíduo, inclusive neurônios, as células reprogramadas, também chamadas de células-tronco de pluripotência induzida (iPS), aparecem como modo alternativo para investigação de neuropatologias, além de facilitar a caracterização de alterações particulares durante o desenvolvimento do sistema nervoso.

Na atual proposta de Emenda está informado que pacientes com esquizofrenia passarão a fazer parte, novamente, do estudo. Também estão incluídos novos pesquisadores que passam a integrar a equipe de pesquisa (a médica pesquisadora Fernanda Tovar Moll e o médico pesquisador Ricardo de Oliveira Souza – ambos vinculados ao Instituto D'OR de Pesquisa e Ensino).

Objetivo da Pesquisa:

Alguns dos objetivos presentes na primeira versão do projeto foram retomados, uma vez que, na fase atual do projeto, passa a ter uma pesquisadora médica responsável pelas biópsias de pele que serão realizadas, assim como o procedimento de coleta de sangue.

Além de preservar os objetivos constantes da versão 1 do projeto a nova versão passa a incluir a esquizofrenia como outro transtorno psiquiátrico a ser estudado, bem como as análises genéticas e a obtenção de neurônios derivados de células-tronco de pluripotência induzida dos participantes.

Endereço: Rua Figueiredo Magalhães, 875
 Bairro: Copacabana CEP: 22.031-010
 UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
 Telefone: (21)2546-3792 Fax: (21)2546-8810 E-mail: uep@copador@copador.com.br

Comitê de Ética em
 Pesquisa - Hospital
 Copa D'Or

HOSPITAL COPA DOR



Continuação do Parecer: 1.188.558

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Foram informados na Emenda ao projeto que após esclarecimentos quanto aos objetivos e metodologia do estudo e assinatura do termo de consentimento, os sujeitos serão submetidos à entrevista e exame psiquiátrico estruturado, agendados de acordo com a disponibilidade dos mesmos. Paralelamente, os prontuários dos sujeitos participantes serão revistos para busca de informações referentes ao diagnóstico, tratamento e evolução dos mesmos, para melhor definição da população estudada. Familiares de primeiro grau dos pacientes serão convidados a participar da entrevista, e seus dados também serão adicionados ao estudo, após assinatura do TCLE.

Quanto à coleta de material biológico (coleta de sangue e também a biópsia de pele), será realizada por profissionais capacitados que habitualmente realizam esses procedimentos. É destacado pelos autores que a biópsia somente será realizada na impossibilidade de se conseguir a coleta de amostra de urina, ou seja, uma vez que esta necessita ser processada imediatamente após coleta e em quantidade suficiente para obtenção das células a serem pesquisadas. Informam ainda que os participantes menores de 18 anos serão submetidos apenas à coleta de urina.

Sobre a extração de DNA, esta ocorrerá somente após a coleta da alíquota de sangue, estando os procedimentos descritos no estudo.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Todas as modificações realizadas no projeto inicial foram descritas na emenda que gera a versão 3 do projeto em referência. As modificações foram elencadas em documento adicional para melhor compreensão da proposta.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos de apresentação obrigatória foram mantidos e as respectivas alterações incluídas, como no título do projeto (inclusão do termo esquizofrenia), e ainda nos termos de consentimento livre e esclarecido e termo de assentimento.

Recomendações:

Não foram identificadas pendências ou necessidade de recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto encontra-se apto para continuidade no seu desenvolvimento.



Endereço: Rua Figueiredo Magalhães, 875
 Bairro: Cascabana CEP: 22.031-010
 UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
 Telefone: (21)2545-3792 Fax: (21)2548-6610 E-mail: ccopador@copador.com.br

HOSPITAL COPA DOR



Continuação do Parecer: 1.168.558

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não



RIO DE JANEIRO, 03 de Agosto de 2015

Assinado por:
DENILSON CAMPOS DE ALBUQUERQUE
(Coordenador)

Endereço: Rua Figuerado Magalhães, 875
Bairro: Copacabana CEP: 22.031-010
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)2545-3752 Fax: (21)2548-8810 E-mail: cncopador@copador.com.br

LISTA DE PUBLICAÇÕES

Submetidas:

JACKMAN, J.A.; COSTA, V.V.; PARK, S.; REAL, A.L.C.V; PARK, J.H.; **CARDOZO, P.L.**; FERHAN, A.R.; OLMO, I.G.; MOREIRA, T.P.; BAMBIRRA, J.L.; QUEIROZ, V.F.; QUEIROZ-JUNIOR, C.M.; FOUREAUX, G.; SOUZA, D.G.; RIBEIRO, F.M.; YOON, B.K.; WYNENDAELE, E.; SPIEGELEER, B.D.; TEIXEIRA, M.M.; CHO, N-J. Therapeutic treatment of Zika virus infection using a brain-penetrating antiviral peptide. *Nature Materials*. No prelo.