

Ana Karolyne Santos Gomes

**EFEITOS DA CITOCINA IL-17A SOBRE CÉLULAS NEURAIS
HUMANAS E NO TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA**

Dissertação apresentada à Faculdade
Israelita de Ciências da Saúde Albert Einstein
para obtenção do Título de Mestre em
Ciências da Saúde

São Paulo

2021

Ana Karolyne Santos Gomes

**EFEITOS DA CITOCINA IL-17A SOBRE CÉLULAS NEURAIS
HUMANAS E NO TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA**

Dissertação apresentada à Faculdade Israelita de Ciências da Saúde Albert Einstein para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Andréa Laurato Sertié

São Paulo
2021

Gomes, Ana Karolyne Santos

Efeitos da citocina IL-17a sobre células neurais humanas e no transtorno do espectro autista / Ana Karolyne Santos Gomes. -- São Paulo, 2021.
x, 62 f.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade Israelita de Ciências da Saúde Albert Einstein. Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

Título em inglês: *Effects of IL-17a cytokine on human neural cells and on autism spectrum disorder.*

1. Transtorno do espectro autista. 2. Infecções. 3. Interleucina-17. 4. Células-tronco pluripotentes induzidas. 5. Transtornos do neurodesenvolvimento.

Elaborada pelo Sistema Einstein Integrado de Bibliotecas

FACULDADE ISRAELITA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE ALBERT EINSTEIN

Coordenador do curso de Pós-Graduação: Prof. Dr. Luiz Vicente Rizzo

Ana Karolyne Santos Gomes

**EFEITOS DA CITOCINA IL-17A SOBRE CÉLULAS NEURAIS
HUMANAS E NO TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA**

Presidente da banca: Profa. Dra. Andréa Laurato Sertié

BANCA EXAMINADORA

Membros titulares:

Profa. Dra. Juliana Magdalon

Profa. Dra. Luciana Cavaleiro Marti

Prof. Dr. Luiz Carlos Santana da Silva

Membros suplentes:

Prof. Dr. Lionel Fernel Gamarra Contreras

Dr. Gerson Shigeru Kobayashi

Aprovada em: 20/12/2021.

Agradecimentos

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro para a realização deste estudo – Código de Processo Nº 2018/25967-5.

Sumário

Agradecimentos.....	v
Lista de figuras	viii
Resumo	x
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Transtorno do espectro autista	1
1.1.1 Breve histórico, sintomatologia e epidemiologia.....	1
1.1.2 Etiologia genética	2
1.1.3 Etiologia ambiental: ativação imune materna	4
1.1.3.1 Efeito aditivo da ativação imune materna e de fatores genéticos de risco ao transtorno do espectro autista	6
1.1.3.2 Ativação imune materna, interleucina IL-17a, neurodesenvolvimento e transtorno do espectro autista	7
1.2 Interleucina 17a: receptores e vias clássicas de sinalização intracelular	8
1.3 Modelo experimental	11
1.4 Objetivos.....	13
2 MÉTODOS	15
2.1 Amostra: aspectos éticos, características e tipo de estudo	15
2.2 Cultivo das amostras de células neuroprogenitoras	16
2.3 Análise da secreção da IL-17a pelas amostras de células neuroprogenitoras por ELISA	16
2.4 Diferenciação das amostras de células neuroprogenitoras para neurônios	17
2.5 Análise da expressão gênica por RT-qPCR	17
2.5.1 Extração e quantificação de RNA	18
2.5.2 Síntese de cDNA e qPCR.....	18
2.6 Análise da expressão proteica por <i>western blotting</i>	19
2.6.1 Extração e quantificação de proteínas totais	20
2.6.2 <i>Western blotting</i>	20
2.7 Análise da proliferação celular.....	22
2.8 Análise da migração celular pelo método da ferida e cicatrização	22
2.9 Análise estatística.....	23
3 RESULTADOS	24

3.1 Caracterização das amostras de células neuroprogenitoras: análise da expressão de marcadores de células neurais e da glia	24
3.2 Expressão da IL17-a e de seu receptor nas amostras de células neuroprogenitoras, e efeito da IL-17a na expressão do receptor	25
3.3 Expressão de componentes das vias de sinalização intracelular ativadas pela IL-17a nas amostras de células neuroprogenitoras	28
3.4 Vias de sinalização intracelular ativadas pela IL-17a nas amostras de células neuroprogenitoras	31
3.5 Efeito da IL-17a na proliferação das amostras de células neuroprogenitoras	34
3.6 Efeito da IL-17a na migração das amostras de células neuroprogenitoras	38
3.7 Efeito da IL-17a na diferenciação neuronal das amostras de células neuroprogenitoras	39
4 DISCUSSÃO	49
5 CONCLUSÕES	54
6 REFERÊNCIAS	56
Abstract	
Apêndices	

Lista de figuras

Figura 1. Arquitetura genética do transtorno do espectro autista	3
Figura 2. Modelo atual de Ativação imune materna e transtornos psiquiátricos do neurodesenvolvimento na prole em humanos	5
Figura 3. Vias de sinalização intracelular canônicas ativadas por IL-17a:IL-17RA/C ...	10
Figura 4. Imagens de imunofluorescência de células neuroprogenitoras, neurônios e astrócitos gerados a partir das iPSCs	12
Figura 5. Expressão proteica constitutiva de SOX2 e GFAP nas amostras de células neuroprogenitoras	25
Figura 6. Expressão gênica e proteica constitutiva de IL17RA/C nas amostras de células neuroprogenitoras	27
Figura 7. Expressão de IL17RA nas amostras de células neuroprogenitoras após tratamento com IL-17a por 48h	28
Figura 8. Expressão gênica e proteica constitutiva de componentes das vias de sinalização intracelular ativadas por IL-17a nas amostras de células neuroprogenitoras	30
Figura 9. Perfil de ativação de pERK1/2 nas amostras de células neuroprogenitoras após tratamento com IL-17a	32
Figura 10. Perfil de ativação de pRPS6 nas amostras de células neuroprogenitoras após tratamento com IL-17a	33
Figura 11. Proliferação das amostras de células neuroprogenitoras após tratamento com IL-17a por 24h até 144h	37
Figura 12. Migração das amostras de células neuroprogenitoras após tratamento com IL-17a	38
Figura 13. Imagem representativa de microscopia óptica por contraste de fase mostrando os neurônios jovens de 14 dias à esquerda e em 21 dias à direita	39
Figura 14. Comparação da expressão gênica e proteica constitutiva de IL17RA entre as amostras de células neuroprogenitoras e neurônios jovens derivados das células neuroprogenitoras	41
Figura 15. Expressão gênica relativa de marcadores de células neuroprogenitoras, neurônios e astrócitos nas amostras de neurônios jovens após tratamento com IL-17a durante o período de neurodiferenciação	42

Figura 16. Expressão proteica relativa de marcadores de células neuroprogenitoras, neurônios e astrócitos nas amostras de neurônios imaturos após tratamento com IL-17a durante o período de neurodiferenciação	44
Figura 17. Expressão proteica relativa de marcadores de células neuroprogenitoras, neurônios e astrócitos nas amostras de neurônios de 21 dias após tratamento com IL-17a durante o período de neurodiferenciação	47

Resumo

Introdução: A ativação imune materna tem sido apontada como importante fator de risco ambiental ao transtorno do espectro autista (autismo). Modelos animais sugerem que após infecção e ativação imune durante a gestação, citocinas pró-inflamatórias maternas podem ultrapassar a placenta e interferir no desenvolvimento do cérebro fetal. Dentre elas, a interleucina 17a parece desempenhar papel etiológico nas alterações da citoarquitetura cerebral e do comportamento associado ao autismo na prole. Contudo, os mecanismos celulares e moleculares pelos quais a IL-17a atua para causar esses fenótipos são ainda pouco compreendidos, sobretudo em humanos. **Objetivos:** Verificar se a IL-17a atua sobre a proliferação, migração e a diferenciação de células neurais humanas. Verificar quais vias de sinalização intracelular são ativadas pela IL-17a e estão relacionadas com esses fenótipos celulares. Verificar se o aumento da IL-17a associado a um *background* genético de risco para o autismo podem agir juntos para “amplificar” alterações em células neurais humanas. **Métodos:** Células neuroprogenitoras derivadas de células-tronco pluripotentes induzidas de indivíduos com autismo (n=7) e indivíduos controles (n=5) foram tratadas com IL-17a ou veículo, e foram realizadas medidas da expressão do receptor da IL-17a (IL17RA/C) e de componentes das vias de sinalização intracelular ativadas por IL-17a; assim como medidas de proliferação, migração e diferenciação neuronal dessas células. **Resultados:** As células neuroprogenitoras expressam constitutivamente IL17RA/C, mas não expressam a IL-17a; a IL-17a ativa a via ERK1/2 e inibe a via mTORC1 nas células neuroprogenitoras derivadas de indivíduos com autismo em comparação com as células neuroprogenitoras controles; a IL-17a não alterou a proliferação e a migração das células neuroprogenitoras; a IL-17a estimulou a expressão de marcadores neuronais durante a diferenciação das células neuroprogenitoras para neurônios. **Conclusões:** Nossos resultados sugerem que células neuroprogenitoras humanas são alvos potenciais da IL-17a uma vez que expressam endogenamente IL-17RA/C, e que essa citocina é capaz de ativar vias de sinalização nessas células; as vias ERK1/2 e mTORC1 podem estar envolvidas em possíveis fenótipos anormais induzidos pela IL-17a nas células neuroprogenitoras derivadas de indivíduos com autismo; a IL-17a estimula a neurogênese ou maturação neuronal das células neuroprogenitoras humanas.

Descritores: Transtorno do espectro autista; Infecções; Interleucina-17; Células-tronco pluripotentes induzidas; Transtornos do neurodesenvolvimento

1.1 Transtorno do espectro autista

1.1.1 Breve histórico, sintomatologia e epidemiologia

O termo autismo foi utilizado originalmente em 1911 pelo psiquiatra Eugen Bleuler, ao referir-se à tendência que indivíduos com esquizofrenia têm de “ensimesmarse”, tornando-se alheios ao mundo social. Em 1943, o psiquiatra infantil Leo Kanner foi quem primeiramente descreveu com maiores detalhes a sintomatologia da doença em sua obra “Distúrbio autístico do contato afetivo”, que relatava o quadro clínico de 11 crianças com “um isolamento extremo desde o início da vida e um desejo obsessivo pela preservação de mesmices”, que Kanner chamou de “autismo infantil precoce”.⁽¹⁾ Em 1944, o pediatra Hans Asperger publicou o artigo “A psicopatia autista na infância” que, além de descrever o quadro clínico, destacou a ocorrência preferencial da doença em meninos.⁽²⁾ Em 1954, a Associação Americana de Psiquiatria publicou a primeira edição do manual diagnóstico e estatístico dos transtornos mentais (DSM-I – *diagnostic and statistical manual of mental disorders I*), que fornece as nomenclaturas e os critérios para o diagnóstico dos transtornos mentais. Nesta versão do documento, as diversas características clínicas do autismo eram classificadas como um subgrupo da esquizofrenia infantil, não podendo ser compreendida como uma patologia específica e singular. Nas próximas edições do DSM, ocorreram diversas mudanças nos critérios para diagnóstico e subcategorias do espectro do autismo.⁽³⁾

Com a mais recente edição do DSM, o DSM-5 publicada em 2013, as subcategorias de autismo típico, síndrome de Asperger, transtorno desintegrativo da infância e transtorno global do desenvolvimento sem outra especificação deixaram de existir como diagnósticos separados, como ocorria em edições anteriores, e atualmente existe apenas um único diagnóstico: transtorno do espectro autista (TEA). Assim, os indivíduos com TEA são agora diagnosticados em um único espectro com diferentes graus de gravidade, e o TEA passa a ser definido por uma tríade de apresentações clínicas principais: deficiência na interação social/comunicação e padrões de comportamento restritos, estereotipados e repetitivos. Ainda, outras manifestações clínicas podem estar presentes, tais como: deficiência intelectual, epilepsia, transtorno

obsessivo compulsivo, ansiedade, problemas gastrointestinais, macrocefalia, dentre outros.⁽⁴⁾

Em relação à prevalência do TEA, estudos recentes apontam que o transtorno tem prevalência de aproximadamente 1 em cada 59 crianças até os 8 anos de idade, acometendo mais o sexo masculino que o feminino, em uma razão de 4:1 em média, não havendo diferença na prevalência com relação à raça ou etnia.⁽⁵⁾ A prevalência do TEA vem crescendo consideravelmente nos últimos anos, o que pode ser devido a um aumento real no número de indivíduos afetados na população por causa, por exemplo, da presença de novos fatores ambientais de risco para o transtorno. Contudo, fatores que sem dúvida têm contribuindo para esse aumento na prevalência do TEA são as mudanças nos critérios diagnósticos, o aumento da eficiência no diagnóstico precoce e o maior conhecimento sobre o TEA tanto pela população em geral quanto por profissionais da saúde.

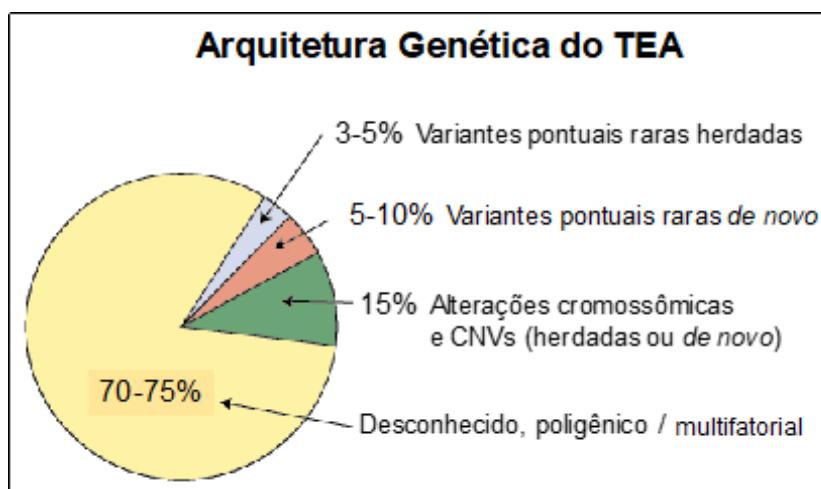
1.1.2 Etiologia genética

Embora para a maior parte dos indivíduos acometidos a etiologia do TEA permaneça desconhecida, sabe-se que vários fatores de risco, desde ambientais, como o consumo de álcool e infecções maternas durante a gestação, a genéticos, incluindo uma combinação de alelos de risco paternos e maternos tanto raros como comuns na população em geral, que podem contribuir para o aparecimento do transtorno.^(6,7) Com base nos estudos de recorrência familiar e de concordância entre gêmeos monozigóticos e dizigóticos, as estimativas da herdabilidade do TEA, que avalia a proporção da contribuição genética na expressão e variabilidade do transtorno, têm variado entre 38-90%,⁽⁷⁻¹²⁾ o que indica a contribuição tanto de fatores genéticos como ambientais na etiologia do transtorno.

A arquitetura genética do TEA é extremamente heterogênea. Por meio do uso tanto de abordagens mais tradicionais, como a cariotipagem e o estudo de genes candidatos, com de abordagens mais modernas, como os *microarrays* cromossômicos e o sequenciamento de nova geração do exoma e do genoma, diversas regiões cromossômicas e genes de risco para o TEA têm sido identificados.

Estima-se que cerca de 15% dos casos de TEA apresentam alterações cromossômicas estruturais, as quais podem ser microscopicamente visíveis ou relativamente menores, conhecidas como variações do número de cópias (CNVs –

copy number variations) de segmentos genômicos,^(13,14) as quais podem conter parte de um gene, um gene inteiro, poucos ou vários genes. Embora existam relatos de anormalidades estruturais em todos os cromossomos, em algumas regiões ocorrem rearranjos mais frequentes, como as CNVs em 15q11-q13, presentes em cerca de 1% dos casos,⁽¹⁵⁾ e as CNVs em 2p16, 16p11.2, 17q12 e 22q13, que combinadas estão presentes em cerca de 2-3% dos casos.^(14,16,17) Outros aproximadamente 10% dos indivíduos com TEA apresentam variantes pontuais (envolvendo um ou poucos nucleotídeos) não sinônimas, raras e potencialmente patogênicas em um gene principal, em um modelo monogênico de herança. Ainda, em muitos indivíduos com TEA não é identificada apenas uma alteração genética rara, mas sim duas ou mais em um modelo oligogênico (oligo = alguns, poucos) de herança. Por fim, na maior parte dos casos, cerca de 70-75%, o TEA parece seguir um modelo poligênico ou multifatorial de herança, no qual o fenótipo depende da interação de diversas variantes genéticas mais frequentes na população e de efeito patogênico baixo combinadas a fatores ambientais de risco⁽⁷⁾ (Figura 1).



TEA: transtorno do espectro autista; CNVs: *copy number variations*. Cerca de 3-5% dos indivíduos com TEA apresentam variantes pontuais raras herdadas, e outros 5-10% dos casos apresentam variantes pontuais raras de novo. Cerca de 15% dos casos apresentam alterações cromossômicas estruturais, as quais podem ser microscopicamente visíveis ou relativamente menores, as CNVs. No restante dos casos, cerca de 70-75%, o TEA apresenta etiologia desconhecida ou poligênica/multifatorial.^(7,11)

Fonte: Traduzido e modificado de Casanova MF. Genetic counseling in autism. In: Cortical chauvinism [Internet]. [place unknown]; 2017 [cited 2020 Dec 1]. Available from: <https://corticalchauvinism.com/2017/03/06/genetic-counseling-in-autism/>.⁽¹⁸⁾ [Figura cedida por ALS]

Figura 1. Arquitetura genética do transtorno do espectro autista

Assim, o TEA é considerado uma doença complexa, podendo envolver diferentes mecanismos mutacionais e modelos de herança. Atualmente, mais de 2000 CNVs e mais de 900 genes candidatos já foram associados ao TEA, e descritos até o momento no banco de dados da *Simons Foundation Autism Research Initiative* (<https://sfari.org>), que agrupa todas as informações já publicadas sobre loci e genes de risco para o transtorno. É interessante notar que apesar da grande heterogeneidade genética, esses genes candidatos tendem a convergir em vias biológicas comuns, que podem ser classificadas em: regulação de transcrição (genes associados ao remodelamento de cromatina e fatores de transcrição); regulação de quantidade de proteínas (genes que regulam *splicing*, tradução e ubiquitinação de proteínas); funcionamento de sinapses (adesão celular, canais de cálcio e sódio, receptores de neurotransmissores); fatores que regulam crescimento, proliferação e diferenciação celular.⁽¹⁹⁻²¹⁾

A descoberta das causas genéticas do TEA auxilia e direciona estudos de diagnóstico molecular da doença, além de melhorar o aconselhamento genético e possíveis terapias precoces direcionadas para cada paciente.⁽¹²⁾

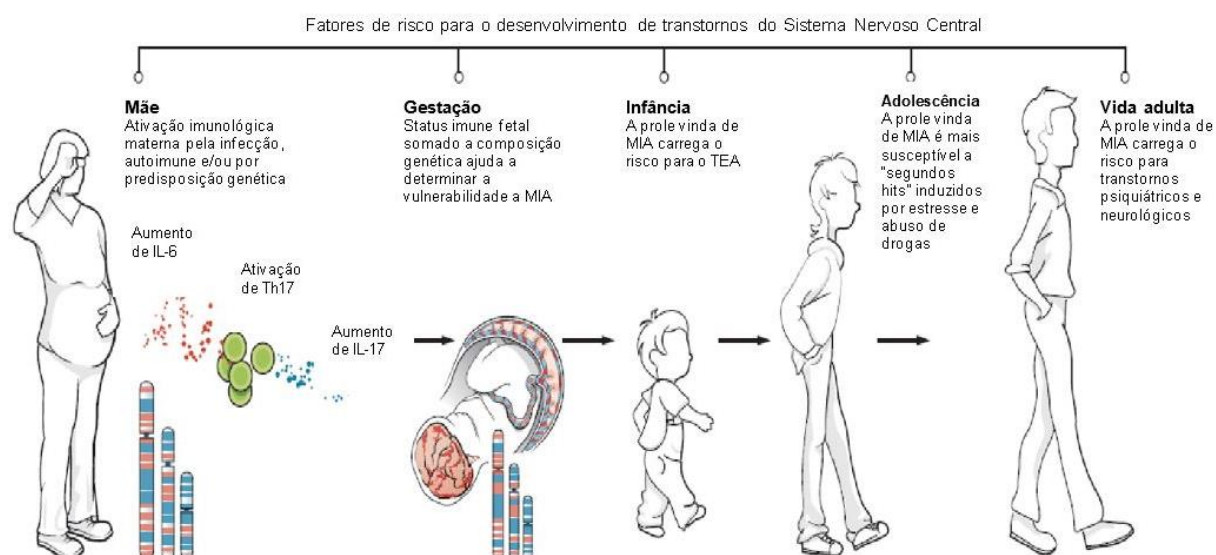
1.1.3 Etiologia ambiental: ativação imune materna

Embora possam existir diversos fatores ambientais que predisponham ao TEA, doenças maternas de cunho imunológico, como autoimunidade e doenças infecciosas na gravidez (como rubéola ou outras infecções virais e bacterianas) que aumentam de forma importante a reatividade do sistema imune materno, têm sido sugeridas como fatores de risco que podem levar a prole a ter transtornos mentais – como TEA, esquizofrenia e depressão-, ou até mesmo a apresentar desregulação de seu próprio sistema imunológico na vida adulta.⁽²²⁻²⁴⁾

O termo ativação imune materna (MIA – *maternal immune activation*), vem sendo utilizado para se referir à ativação do sistema imune materno frente a uma infecção durante a gestação causando uma cascata de acontecimentos imunes, como diferenciação de linfócitos e liberação de citocinas e anticorpos, que seriam considerados fatores de risco para o desenvolvimento de doenças de cunho psiquiátrico na prole.⁽²⁵⁾ A MIA foi primeiramente associada ao TEA pela observação do aumento da incidência deste transtorno de 0,05 para 8-13% em crianças filhas de mães que foram expostas à

pandemia da rubéola em 1964.⁽²⁶⁾ Desde então, diversos estudos epidemiológicos têm sugerido que a ocorrência de uma infecção importante durante a gestação aumenta o risco da prole desenvolver TEA. Além disso, esses estudos sugerem que o primeiro trimestre da gestação parece ser o período mais susceptível para que uma infecção materna importante leve ao desenvolvimento do TEA na prole, por ser este um período crítico para o neurodesenvolvimento do feto e também de maiores eventos de liberação de citocinas pela mãe.^(25,27-29)

Os modelos mais atuais da associação entre MIA e transtornos do neurodesenvolvimento sugerem que após uma infecção materna ocorre a liberação aumentada de citocinas pró-inflamatórias na circulação sanguínea da mãe que podem ultrapassar a placenta e interferir no desenvolvimento cerebral do feto.^(30,31) Esse fato, em combinação com a carga genética de suscetibilidade da prole e, no caso de doenças psiquiátricas de início mais tardio como a esquizofrenia, em combinação com segundos “hits” ambientais durante a infância e adolescência – como mudanças hormonais, estresse e abuso de drogas -, leva ao aumento da probabilidade dos transtornos psiquiátricos, como esquematizado na figura 2.⁽²³⁾



IL-6: interleucina 6; Th17: linfócitos T *helper* 17; IL-17: interleucina 17; MIA: *maternal immune activation*; TEA: transtorno do espectro autista.

Fonte: Traduzido e adaptado de Estes ML, McAllister AK. Maternal immune activation: implications for neuropsychiatric disorders. *Science*. 2016;353(6301):772-7. Figure 1, MIA as a disease primer; p. 773.⁽²³⁾

Figura 2. Modelo atual de Ativação imune materna e transtornos psiquiátricos do neurodesenvolvimento na prole em humanos

1.1.3.1 Efeito aditivo da ativação imune materna e de fatores genéticos de risco ao transtorno do espectro autista

Diferentes estudos sugerem uma possível interação entre MIA e genes de suscetibilidade ao TEA, como os da via mTORC1, tornando os sinais clínicos da doença ainda mais acentuados, como nos exemplos a seguir. Ehninger et al.⁽³²⁾ utilizando camundongos heterozigotos para variantes de perda de função no gene *tsc2* – produz a proteína TSC2 que ativa indiretamente a via mTORC1 - (*tsc2+/-*), os quais são modelos para o complexo de esclerose tuberosa – síndrome de herança autossômica dominante que apresenta alta prevalência de TEA no quadro clínico, descreveram aumento de mortalidade intrauterina e de comportamento semelhante ao TEA nos camundongos *tsc2+/-* cujas mães foram submetidas à MIA durante o período gestacional. Le Belle et al.⁽³³⁾ descreveram crescimento ainda mais aumentado do encéfalo em camundongos heterozigotos para variantes de perda de função no gene *pten* – gene que produz a proteína PTEN, que ativa indiretamente a via mTORC1 - (*pten+/-*) cujas mães foram submetidas a MIA durante o período gestacional. Os camundongos *pten+/-* são modelo de TEA associado à macrocefalia. Ainda, mais recentemente, um estudo em humanos mostrou que indivíduos com TEA que apresentam CNVs de risco e cujas mães tiveram infecções durante o período gestacional apresentam deficiência mais acentuada na interação social e nos comportamentos restritos e repetitivos.⁽³⁴⁾

Por fim, trabalhos recentes de expressão gênica global no cérebro de ratos após a MIA mostraram que diversos dos genes desregulados identificados já foram fortemente associados à patogênese do TEA e codificam proteínas envolvidas nos processos de neurogênese e funcionamento neural. Dentre os genes desregulados, estão os que são alvos de FMR1 e CDH8, e os que codificam proteínas envolvidas com início de tradução, como genes da via de sinalização mTORC1, os quais já foram fortemente associados ao TEA.⁽³⁵⁻³⁷⁾ Esses resultados sugerem que a MIA parece induzir desregulação das mesmas vias biológicas encontradas alteradas nos indivíduos com TEA que têm etiologia genética comprovada.

1.1.3.2 Ativação imune materna, interleucina IL-17a, neurodesenvolvimento e transtorno do espectro autista

Os mecanismos pelos quais a MIA contribui para transtornos do neurodesenvolvimento na prole são melhores elucidados em modelos animais, sobretudo em roedores,⁽³⁸⁻⁴¹⁾ mas também em primatas não humanos.^(42,43) Trabalhos pioneiros utilizando o modelo de MIA em camundongos mostraram que após a indução de uma infecção ocorre a passagem de citocinas pró-inflamatórias maternas pela barreira placentária, sendo a principal delas a interleucina 6 (IL-6), e que essa citocina era capaz de causar anormalidades cerebrais e sinais clínicos semelhantes ao do TEA na prole.^(44,45)

Mais recentemente, um importante estudo também utilizando o modelo de MIA em camundongos – injeção de poly(I:C), que mimetiza uma infecção viral, em camundongos fêmeas prenhas no 12,5º dia do desenvolvimento embrionário (E12,5) – mostrou que o aumento sistêmico de IL-6 materno após a MIA causa ativação de vias de diferenciação de células Th17, um subtipo de linfócitos auxiliares CD4+, pelo aumento da expressão dos fatores de transcrição clássicos destas vias, como *retinoic acid receptor-related orphan receptor-γt* (RORγt) e *signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3), fazendo com que essas células liberem na corrente sanguínea materna e na placenta grande quantidade da interleucina 17a (IL-17a). Uma vez em quantidades anormalmente altas, a IL-17a parece então ser capaz de ultrapassar a placenta e estimular a expressão de seu receptor (IL17RA) no córtex cerebral em desenvolvimento do feto (no período E14,5 do desenvolvimento embrionário), sendo este ambiente rico em IL-17a responsável pelo desenvolvimento anormal da citoarquitetura laminar do córtex cerebral da prole, a qual permanece alterada após o nascimento. Este ambiente rico em IL-17a também parece ser responsável pelos comportamentos semelhantes ao TEA observados na prole após o nascimento.⁽⁴⁶⁾ De forma interessante, a injeção da IL-17a diretamente no cérebro fetal no período E14,5 e na ausência de MIA também induziu os mesmos fenótipos na anatomia cerebral e no comportamento da prole. Ainda, esses fenótipos anormais foram prevenidos com a inibição da expressão tanto do fator de transcrição RORγt como da IL-17a nas células T CD4+ maternas. Em conjunto, esses resultados sugerem que a IL-17a, a jusante (*downstream*) da IL-6,

parece ser a citocina responsável por estimular essas anormalidades na prole semelhantes a fenótipos de indivíduos com TEA.⁽⁴⁶⁾

Estudos posteriores do mesmo grupo de pesquisa mostraram que as anormalidades vistas na citoarquitetura cerebral da prole vinda de MIA estão preferencialmente localizadas em uma região chamada zona disgranular do córtex somatossensorial primário (S1DZ – *dysgranular zone of the primary somatosensory cortex*). Neurônios excitatórios desta região estão hiperativados e neurônios inibitórios estão menos expressos na prole de MIA, o que contribui para o desenvolvimento dos fenótipos comportamentais semelhantes ao TEA, e que a redução induzida desta atividade neural na região S1DZ durante o neurodesenvolvimento recupera as anormalidades comportamentais vistas na prole.^(47,48)

É importante comentar também outros estudos que sugeriram um potencial papel da IL-17a no neurodesenvolvimento. Estudos utilizando células progenitoras neurais (NPCs – *neural progenitor cells*) *in vitro* são concordantes em mostrar que o tratamento com IL-17a inibe a proliferação de NPCs provenientes tanto de embriões de camundongos em E14,0⁽⁴⁹⁾ como de camundongos neonatos,⁽⁵⁰⁾ mas são discordantes em mostrar que IL-17a inibe a neurogênese e maturação neuronal.^(49,50)

Por fim, cabe ressaltar que em relação ao TEA em humanos, estudos sugerem associação entre desregulação da IL-17a e o maior risco de desenvolvimento do TEA ou a piora no quadro clínico. Um estudo mostrou que o gene que codifica IL-17a está contido em uma região afetada por CNVs associadas ao TEA,⁽⁹⁾ e alguns estudos mostraram aumento dos níveis de IL-17a no soro de indivíduos com TEA.^(51,52) Ainda, um trabalho recente mostrou que monócitos derivados de indivíduos com TEA expressam mais a IL-17a, o que ativa o fator de transcrição NF- κ B e induz expressão de iNOS e inflamação oxidativa nessas células.⁽⁵³⁾

1.2 Interleucina 17a: receptores e vias clássicas de sinalização intracelular

Como acima mencionado, a IL-17a é uma interleucina pró-inflamatória no sistema imune liberada principalmente por linfócitos Th17 quando instaladas infecções tanto crônicas quanto agudas, e desempenha um papel essencial na defesa do organismo por induzir a produção de diversas citocinas (tais como GM-CSF, G-CSF, IL-6, IL-1 β , TNF α) e quimiocinas (tais como CCL20 e CXCL1) por diferentes tipos

celulares, o que recruta neutrófilos, aumenta a produção de anticorpos por linfócitos B e medeia inflamação.^(54,55) A atividade inapropriada da IL-17a, principalmente na forma crônica, tem sido associada à patogênese de doenças autoimunes e inflamatórias, como artrite reumatoide, asma, e esclerose múltipla.⁽⁵⁶⁾

A IL-17a é a mais investigada em sua família de 6 citocinas (IL-17a a IL-17f), seguida de sua homóloga IL-17f, as quais podem se ligar ao receptor presente na membrana plasmática como um homodímero (IL-17a/a ou IL-17f/f) ou como um heterodímero (IL-17a/f).^(57,58) O receptor da IL-17a, por sua vez, é composto por um heterodímero de IL17RA/IL17RC, sendo a porção IL17RA a mais importante para a transdução de sinal intracelular.⁽⁵⁹⁾ As vias de sinalização intracelular clássicas conhecidas que são ativadas após a ligação da IL-17a a seu receptor levam, sobretudo, à expressão de genes que codificam proteínas ligadas ao processo inflamatório (geralmente genes que têm em seu promotor domínios de ligação aos fatores de transcrição NF- κ B e AP-1), como outras citocinas pró-inflamatórias, peptídeos antimicrobianos, metaloproteinases de matriz, dentre outras.

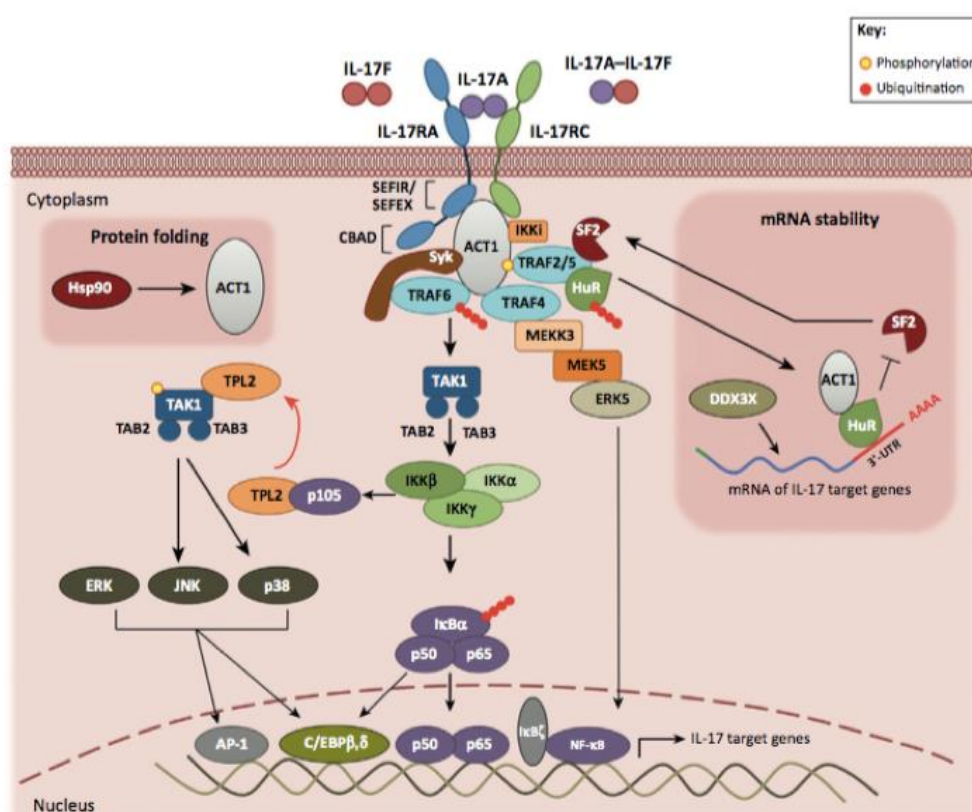
A sinalização da IL-17a inicia pelo recrutamento da proteína adaptadora ACT1, que então ativa várias vias de sinalização intracelular independentes por meio de diferentes proteínas adaptadoras TRAF (*TNF – receptor associated factors*). Ao ligar-se a ACT1, a proteína TRAF6, membro da família das proteínas ubiquitina-ligases, é ativada, o que resulta na subsequente ativação da quinase TAK1 e do complexo IKK, composto por IKK α , IKK β e IKK γ . Esse complexo então fosforila a subunidade I κ B α dos complexos NF- κ B:I κ B α , o que induz a degradação de I κ B α pelo sistema proteossoma e expõe o sinal de localização nuclear dos fatores de transcrição da família NF- κ B (sobretudo das proteínas p50 e p65), que em seguida se deslocam para o núcleo celular e ativam a expressão de genes ligados à inflamação⁽⁵⁹⁻⁶³⁾ (Figura 3).

A ativação do complexo IKK também ativa a quinase TPL2 que, por sua vez, ativa as quinases da família MAPK, JNK e p38, por meio da fosforilação de resíduos específicos dessas proteínas. Por outro lado, os mecanismos pelos quais a IL-17a ativa ERK1/2, outra quinase da família MAPK, não são ainda bem conhecidos. As quinases JNK, p38 e ERK1/2 ativam os fatores de transcrição AP-1, C/EBP β e C/EBP δ , os quais também regulam a expressão de genes ligados à inflamação^(58,59) (Figura 3).

A IL-17a também ativa as quinases MEKK3 e MEK5 por meio da ativação de TRAF4, o que resulta na ativação da quinase ERK5. Como essa via não

passa por NF- κ B, p38, JNK ou ERK1/2, é considerada uma via não-canônica de sinalização da IL-17a^(58,59,64) (Figura 3).

Por fim, enquanto a sinalização de IL-17a via TRAF6 e TRAF4 resulta na transcrição de genes de resposta inflamatória, a sinalização via complexo ACT1-TRAF2-TRAF5 resulta no controle da estabilidade dos RNA mensageiros de genes que são alvos da IL-17a, como forma de autorregulação pós-transcricional da via^(58,59) (Figura 3).



Fonte: Amatya N, Garg AV, Gaffen SL. IL-17 signaling: the Yin and the Yang. Trends Immunol. 2017;38(5):310-22. Figure 3, Activation of IL-17 signal transduction; p. 314.⁽⁵⁹⁾

Figura 3. Vias de sinalização intracelular canônicas ativadas por IL-17a:IL-17RA/C

Além da IL-17a desempenhar um papel importante no combate a infecções, outras funções biológicas têm sido atribuídas a essa interleucina, como estimulação da proliferação de células-tronco mesenquimais (por meio de ACT1-TRAF6 e da fosforilação e ativação de MEK, ERK, p38 e I κ B α),⁽⁶⁵⁾ de queratinócitos (por meio da ativação da via de sinalização ACT1-TRAF4-MEKK3-ERK5)⁽⁶⁶⁾ e de células sinoviais (por meio da ativação da via mTOR).⁽⁶⁷⁾ Assim, a depender do tipo celular e dos

processos biológicos mediados pela IL-17a, diferentes vias de sinalização intracelular podem ser ativadas.

É importante ressaltar também que o receptor IL17RA é expresso ubiquamente na maioria das células do corpo, com maior expressão em células hematopoiéticas e imunes.⁽⁶⁰⁾ Entretanto, células não hematopoiéticas/imunes - como células epiteliais, endoteliais e fibroblastos – são as que geralmente respondem primeiramente e com maior intensidade à IL-17a,^(68,69) mostrando que a maior expressão do receptor não necessariamente indica uma maior resposta ou ativação de mecanismos intracelulares nas células-alvo.^(70,71) No cérebro adulto, expressão baixa de IL17RA foi detectada em condições fisiológicas na micróglia e nos astrócitos,^(72,73) nos oligodendrócitos⁽⁷⁴⁾ e nas células granulares do cerebelo.⁽⁷⁵⁾ No cérebro fetal, expressão de IL17RA foi detectada em células progenitoras neurais,⁽⁴⁹⁾ mas não em neurônios.⁽⁷³⁾

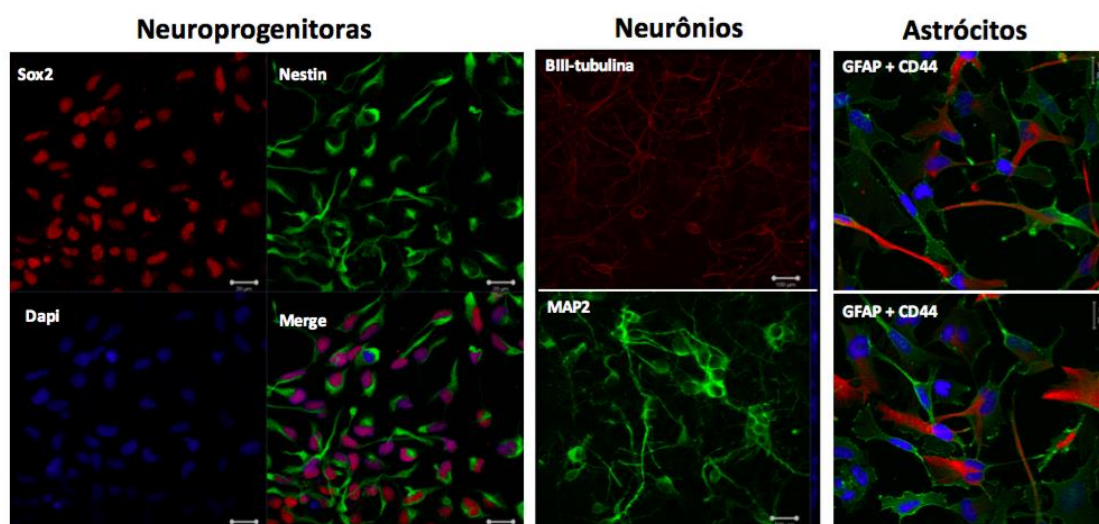
1.3 Modelo experimental

Embora a associação entre MIA, IL-17a e transtornos do neurodesenvolvimento pareça estar bem estabelecida, sobretudo em modelos animais, os mecanismos celulares e moleculares que podem contribuir para as alterações no desenvolvimento cerebral e para o fenótipo de TEA na prole de mães que sofreram MIA são ainda pouco conhecidos e explorados. Esses mecanismos são ainda menos entendidos em humanos. Não se sabe, por exemplo, se a IL-17a atua sobre a proliferação, migração e diferenciação de células neurais humanas durante o neurodesenvolvimento e quais são as vias de sinalização intracelular que são ativadas por IL-17a que estão relacionadas com possíveis fenótipos alterados dessas células. Não é conhecido também se a IL-17a regula a atividade da via de sinalização mTORC1 em células neurais, cuja desregulação já foi fortemente associada tanto à MIA⁽³⁶⁾ como ao TEA,⁽³⁷⁾ e se essa via está associada com fenótipos alterados dessas células. Ainda, é desconhecido também se o aumento da IL-17a no período do neurodesenvolvimento, aliado a um *background* genético de risco para o TEA, pode agir para amplificar alterações em células neurais que podem conferir risco maior de desenvolvimento da doença.

O presente trabalho de pesquisa pretende explorar algumas das questões acima levantadas tendo como hipóteses que: i) a IL-17a atua sobre células neurais humanas alterando o potencial de proliferação e/ou migração e/ou diferenciação

dessas células; ii) o efeito da IL-17a sobre células neurais provenientes de indivíduos com TEA é diferente do efeito sobre células neurais provenientes de indivíduos sem o transtorno (controles), sendo portanto um fator ambiental de risco que atua em sinergia com fatores genéticos de risco ao TEA.

Para testar as hipóteses acima levantadas, foram utilizadas como modelo experimental NPCs derivadas de diferentes clones de células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs – *induced pluripotent stem cells*)⁽⁷⁶⁾ que já haviam sido previamente geradas por nosso grupo de pesquisa a partir de células-tronco da polpa de dentes decíduos de indivíduos controles (n=5) e de indivíduos com TEA (n=7).^(77,78) Cabe ressaltar também que todas essas amostras de NPCs já haviam sido caracterizadas quando à morfologia e expressão de marcadores deste tipo celular (como Nestina e SOX2), e ao serem estimuladas com meios específicos, são capazes de se diferenciar em neurônios e astrócitos (Figura 4).



As NPCs expressam os marcadores Nestina (verde) e SOX2 (vermelho); os neurônios expressam os marcadores β III-tubulina (vermelho) e MAP2 (verde); e os astrócitos expressam os marcadores GFAP (verde) e CD44 (vermelho). Aumento de 20x no microscópio confocal.
Figura 4. Imagens de imunofluorescência de células neuroprogenitoras, neurônios e astrócitos gerados a partir das iPSCs

Um estudo recente de nosso grupo analisou dados de transcriptoma (sequenciamento de nova geração de mRNA, RNAseq) dessas amostras de NPCs e mostrou que elas apresentam um perfil de expressão gênica semelhante ao cérebro fetal de 4-10 semanas pós-concepção, e com identidade de células presentes no córtex cerebral.⁽⁷⁸⁾ Esses resultados sugerem que essas células constituem um modelo de células neurais corticais em um período precoce do neurodesenvolvimento. Ainda, cabe

ressaltar que células neurais derivadas de iPSCs de indivíduos com TEA têm se mostrado um modelo experimental *in vitro* muito interessante e apropriado para o estudo da patofisiologia do transtorno.⁽⁷⁹⁻⁸²⁾

Por fim, é importante ressaltar que dentre os indivíduos com TEA cujas NPCs foram utilizadas neste trabalho, 4 apresentam TEA idiopático (e de provável origem multifatorial) e 3 apresentam TEA de origem genética conhecida (e de provável modelo oligogênico de herança): 1 apresenta uma duplicação em 15q11-13, outro apresenta uma duplicação em 17p13.3, e outro apresenta uma mutação patogênica *de novo* no gene *CACNA1H* e também é heterozigoto composto para variantes de risco no gene *RELN*, e todas essas variantes estão associadas com penetrância incompleta do TEA.^(77,78,83,84) Como a maior parte dos casos o TEA (70-75%) apresenta provável herança multifatorial de causa ainda desconhecida e em cerca de 25-30% dos casos o transtorno segue um modelo monogênico ou oligogênico de herança, julgamos que com a amostra de pacientes que estudamos tivemos a possibilidade de explorar a ação da citocina IL-17a sobre células neurais derivadas de indivíduos com TEA devido a diferentes mecanismos genéticos, o que é bastante representativo da natureza etiológica do transtorno.

1.4 Objetivos

1. Verificar se células neuroprogenitoras derivadas de células-tronco pluripotentes induzidas de indivíduos controles e de indivíduos com transtorno do espectro autista expressam de forma constitutiva a interleucina IL-17a e seu receptor, e se a expressão do receptor de IL-17a é modulada por essa citocina;

2. Verificar se células neuroprogenitoras derivadas de células-tronco pluripotentes induzidas de indivíduos controles e de indivíduos com transtorno do espectro autista expressam de forma constitutiva componentes das vias de sinalização intracelular clássicas *downstream* à IL-17a, e quais dessas vias são ativadas por IL-17a;

3. Verificar se o tratamento com IL-17a ativa a via de sinalização mTORC1 nas células neuroprogenitoras derivadas de células-tronco pluripotentes induzidas de indivíduos controles e de indivíduos com transtorno do espectro autista;

4. Verificar se a IL-17a altera os fenótipos de proliferação, migração e diferenciação das células neuroprogenitoras derivadas de células-tronco pluripotentes induzidas de indivíduos controles e de indivíduos com transtorno do espectro autista;

5. Verificar se existe diferença nas respostas celulares e moleculares relacionadas à IL-17a entre as células neuroprogenitoras derivadas de células-tronco pluripotentes induzidas de indivíduos controles e de indivíduos com transtorno do espectro autista;

6. Verificar quais vias de sinalização intracelular *downstream* à IL-17a estão associadas com os possíveis fenótipos alterados observados em (4) e (5).

2 MÉTODOS

2.1 Amostra: aspectos éticos, características e tipo de estudo

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em seres humanos do Hospital Israelita Albert Einstein (CAAE: 50374315.9.1001.0071; Número do Parecer: 1.369.131). Os indivíduos com TEA (n=7) estudados neste trabalho foram diagnosticados por equipe multiprofissional especializada de acordo com os critérios do DSM-V-TR⁽⁴⁾ e, sempre que possível, a ferramenta CARS-BR traduzida (*Childhood Autism Rating Scale*) foi aplicada em forma de entrevista aos pais ou responsáveis. Todos os indivíduos estudados neste projeto são do sexo masculino, etnia caucasiana, brasileiros, não relacionados entre si e possuíam idade entre 6 e 12 anos no momento da coleta do material biológico.

Como comentado no item 1.3, dentre os indivíduos com TEA estudados neste projeto, 4 apresentam TEA idiopático e de provável origem multifatorial (chamaremos aqui de “grupo TEA idiopático”) e 3 apresentam TEA de origem genética conhecida (chamaremos aqui de grupo “TEA mutação associada”), sendo que 1 indivíduo apresenta uma duplicação no cromossomo 15q11-13, outro apresenta uma duplicação no cromossomo 17p13.3, e outro apresenta uma mutação patogênica *de novo* no gene *CACNA1H* e duas mutações patogênicas em heterozigose composta no gene *RELN*. As CNVs em 15q e 17p foram previamente detectadas por *array*-CGH, e as variantes pontuais nos genes *CACNA1H* e *RELN* foram previamente detectadas por sequenciamento completo do exoma pelo grupo da Dra. Maria Rita Passos Bueno do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.^(78,85)

Os indivíduos controles (n=5) dos quais as células que foram estudadas neste trabalho derivam foram pareados por sexo e idade com os indivíduos com TEA e apresentam exclusão diagnóstica deste transtorno (chamaremos de grupo controle).

Este trabalho, portanto, trata-se de uma pesquisa com seres humanos em um estudo do tipo transversal quanto ao período de coleta da amostra e um estudo analítico primário do tipo experimental *in vitro* e sem mascaramento, por se tratar de estudo apenas com as células dos indivíduos submetidas à tratamentos *in vitro* com observações e medições feitas a cada período finalizado.

2.2 Cultivo das amostras de células neuroprogenitoras

Como comentado no item 1.3, todas as linhagens de NPCs utilizadas neste projeto são derivadas de iPSCs que já haviam sido previamente geradas a partir de células de polpa de dentes decíduos de indivíduos neurotípicos e indivíduos com TEA em colaboração com a Dra. Maria Rita Passos-Bueno e Dra. Karina Griesi-Oliveira.^(77,78,86) Foram usados 1 clone de iPSC de cada indivíduo com TEA e de 1 a 2 clones de iPSCs de cada indivíduo controle (totalizando n=7 amostras de iPSCs controles). Todas as amostras foram armazenadas em nitrogênio líquido até os seus respectivos usos nos experimentos, os quais foram feitos com as NPCs nas passagens entre 8 e 13.

As amostras de NPCs foram cultivadas e mantidas em monocamada, em placas previamente tratadas com 10µg/mL de poli-ornitina (Sigma) e 5µg/mL de laminina (ThermoFisher) em meio Neurobasal (NB) composto por DMEM/F12 (ThermoFisher), 1% B27 (ThermoFisher), 0,5% N2 (ThermoFisher), 0,02% do antibiótico Normocin (Sigma Aldrich) e suplementado com os fatores de crescimento 20ng/mL FGF2 (ThermoFisher) e 20ng/mL EGF (ThermoFisher).

As amostras de NPCs foram cultivadas na presença de IL-17a recombinante humana (PHC9171, ThermoFisher) nas concentrações de 10ng/mL e/ou 50ng/mL⁽⁴⁹⁾ ou na presença do veículo (água ultrapura) por diferentes tempos dependendo da finalidade, conforme descrito abaixo.

2.3 Análise da secreção da IL-17a pelas amostras de células neuroprogenitoras por ELISA

Para verificar se as amostras de NPCs em condições basais sintetizam e secretam IL-17a, as células foram cultivadas em placas de 6cm até atingirem 90% de confluência. O meio de manutenção das NPCs (meio NB) foi então trocado e as células foram mantidas por mais 48h neste meio. Após esse período, 2,5mL do sobrenadante de cada amostra foram coletados em tubos cônicos de 15mL, foram adicionados 10µL de inibidores de proteases (ThermoFisher), e os sobrenadantes foram então congelados a -80°C até o uso subsequente. Para precipitação das proteínas das amostras de sobrenadante, foi adicionada acetona a 4°C, numa proporção de 3:1, e as

amostras foram mantidas *overnight* a -20°C. No dia seguinte, os tubos foram centrifugados a 4000g por 15min a 4°C, os sobrenadantes da centrifugação foram descartados, e os pellets ressuspensos em tampão RIPA com inibidores de proteases (1:100, ThermoFisher).

Esses concentrados proteicos dos sobrenadantes foram utilizados para o ensaio *Human IL-17A SingleStep ELISA® Kit* (Abcam – ab216167), de acordo com o protocolo do fabricante. A leitura de absorbância foi feita no espectrofotômetro Glomax (Biorad).

2.4 Diferenciação das amostras de células neuroprogenitoras para neurônios

Para estímulo da neurodiferenciação *in vitro*, as amostras de NPCs foram cultivadas em monocamada, em placas previamente tratadas com 20µg/mL de poli-ornitina (Sigma) e 10µg/mL de laminina (ThermoFisher), em meio composto por DMEM/F12 (ThermoFisher), 2% B27 (ThermoFisher), 1% N2 (ThermoFisher) e 0,02% do antibiótico Normocin (Sigma Aldrich), sem adição dos fatores de crescimento EGF e FGF. As células foram mantidas em cultura neste meio acrescido de 10 e 50ng/mL de IL-17a ou do veículo (água ultrapura) por 14 dias (gerando neurônios jovens) e 21 dias (gerando neurônios intermediários), e o meio trocado a cada 3 dias até o devido processamento das células.

2.5 Análise da expressão gênica por RT-qPCR

A metodologia de RT-qPCR foi utilizada para verificar se:

(i) as amostras de NPCs e neurônios jovens expressam de forma constitutiva o receptor da IL-17a (subunidades IL17RA e IL17RC), e se essa expressão é diferente entre as células derivadas de indivíduos controles e com TEA;

(ii) as amostras de NPCs expressam de forma constitutiva IL-17a, IL-17f, e genes que codificam componentes das vias de sinalização clássicas *downstream* à IL17RA e da via mTORC1, e se essa expressão é diferente entre as NPCs derivadas de indivíduos controles e com TEA;

(iii) a citocina IL-17a altera a expressão de genes que codificam marcadores de NPCs, neurônios e astrócitos nas amostras de neurônios jovens, e se esse efeito é diferente entre as NPCs derivadas de indivíduos controles e com TEA.

Para analisar o efeito da IL-17a sobre a expressão gênica do receptor IL17RA, as amostras de NPCs foram cultivadas na presença de 10 e 50ng/mL de IL-17a ou na presença do veículo por 48h. Para analisar o efeito da IL-17a sobre a expressão de genes que codificam marcadores de NPCs, neurônios e astrócitos, as amostras de NPCs foram cultivadas na presença de 10ng/mL de IL-17a ou na presença do veículo por 14 dias.

2.5.1 Extração e quantificação de RNA

RNA total foi extraído das amostras de NPCs e das células derivadas da neurodiferenciação (neurônios jovens) por meio do kit Nucleo Spin RNA (Macherey-Nagel), seguindo manual do fabricante. A concentração e qualidade do RNA das amostras foram verificadas pelo espectrofotômetro NanoDrop™ One (ThermoFisher) logo após a extração, com valores de razão 260/280 aceitos entre 1,8 e 2,0, e de razão 230/280 aceitos entre 2,0-2,2, como sugerido pelo fabricante (*Nanodrop Technical Support Bulletin*).

2.5.2 Síntese de cDNA e qPCR

A síntese do cDNA das amostras com adequado grau de pureza foi realizada a partir de 1µg de RNA empregando o kit SuperScript™ III First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR (ThermoFisher), seguindo as instruções do fabricante. As reações de qPCR foram realizadas utilizando 60ng de cDNA de cada amostra em 12µL de volume final, em duplicata, e foram conduzidas no equipamento termociclador QuantStudio 6 (Applied Biosystems). Uma amostra-referência, constituída de quantidades equivalentes de cDNA de cada uma das amostras foi utilizada em cada placa, para uso no cálculo de expressão. A quantificação relativa da expressão gênica foi analisada com o método comparativo Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$), utilizando como Ct referência o Ct do gene endógeno *HMBS*. Cada amostra foi analisada em duplicata, sendo o resultado representado pelo valor das médias.

As sondas *TaqMan*[™] comerciais (ThermoFisher) usadas para quantificação dos genes foram:

(i) *IL17RA* (*hs001056316*), *IL17RC* (*hs00994305*), *IL-17A* (*hs00174383*), *IL17F* (*hs01028648*) – amplificam as subunidades dos receptores de IL-17a e as citocinas IL-17a e IL-17f respectivamente;

(ii) *TRAF3IP2* (que codifica a proteína ACT1) (*hs00974570*), *RELA* (que codifica a proteína NF-KBp65) (*hs01042014*), *NFKB1* (que codifica a proteína NF-KBp50) (*hs00765730*), *NFKBIZ* (que codifica a proteína IκBζ) (*hs0020071*), e *CEBPD* (que codifica a proteína C/EBP-delta) (*hs00270931*) – amplificam componentes das vias de sinalização intracelulares clássicas *downstream* à IL17RA;

(iii) *SOX2* (*hs1053049*), *MAP2* (*hs258900*), *GFAP* (*hs909233*) – amplificam marcadores específicos de NPCs, neurônios e astrócitos respectivamente.

(iv) *HMBS* (*hs609296*) – amplifica o gene utilizado como controle endógeno *HMBS*.

2.6 Análise da expressão proteica por *western blotting*

A metodologia de *western blotting* foi utilizada para verificar se:

(i) as diferentes linhagens de NPCs expressam níveis semelhantes de marcadores de NPCs, neurônios e astrócitos (caracterização das NPCs);

(ii) as amostras de NPCs e neurônios jovens expressam de forma constitutiva o receptor IL17RA, e se essa expressão é diferente entre as células derivadas de indivíduos controles e com TEA;

(iii) a citocina IL-17a altera a expressão do receptor IL17RA nas amostras de NPCs, e se esse efeito é diferente entre as amostras de NPCs derivados de indivíduos controles e com TEA;

(iv) as amostras de NPCs expressam de forma constitutiva proteínas componentes das vias de sinalização intracelular clássicas *downstream* à IL17RA, e se essa expressão é diferente entre as células derivadas de indivíduos controles e com TEA;

(v) a citocina IL-17a ativa vias de sinalização intracelular clássicas *downstream* à IL17RA nas amostras de NPCs, e se esse efeito é diferente entre as amostras de NPCs derivadas de indivíduos controles e com TEA;

(vi) a citocina IL-17a ativa a via de sinalização mTORC1 nas amostras de NPCs, e se esse efeito é diferente entre as amostras de NPCs derivadas de indivíduos controles e com TEA;

(vii) a citocina IL-17a altera a diferenciação neuronal das amostras de NPCs, e se esse efeito é diferente entre as amostras de NPCs derivados de indivíduos controles e com TEA.

Para analisar o efeito da IL-17a sobre a expressão proteica do receptor IL17RA, as amostras de NPCs foram cultivadas na presença de 10 e 50ng/mL de IL-17a ou na presença do veículo por 48h. Para analisar o efeito da IL-17a sobre a diferenciação das amostras de NPCs em neurônios, as células foram cultivadas na presença 10 e/ou 50ng/mL de IL-17a ou na presença do veículo por 14 dias (gerando neurônios jovens) e 21 dias (gerando neurônios intermediários), conforme acima descrito. Para analisar o efeito da IL-17a na ativação de vias de sinalização *downstream* à IL17RA, foi realizado um experimento de *time course*, no qual as amostras de NPCs foram cultivadas com 50ng/mL de IL-17a por 0, 5, 15 e 30min.⁽⁶⁵⁾

2.6.1 Extração e quantificação de proteínas totais

Proteínas totais das amostras de NPCs e neurônios jovens e intermediários foram extraídas com auxílio do tampão RIPA (Sigma) suplementado com inibidores de proteases e fosfatases (1:100; Sigma Aldrich). A quantificação das amostras foi feita por ensaio colorimétrico de ácido bicinconínico (BCA), pelo kit *Pierce™ BCA Protein Assay* (ThermoFisher), seguindo instruções do fabricante. A absorvância das amostras foi determinada no equipamento *Glomax® Discover Microplate Reader* (Promega) em comprimento de onda de 560nm. Cada amostra foi quantificada em duplicata.

2.6.2 Western blotting

Cerca de 5-20µg de proteínas totais das amostras de NPCs e de neurônios jovens e intermediários foram misturadas em tampão de amostra contendo Azul de bromofenol (Sigma Aldrich) e Ditiotretol (DTT) (Sigma Aldrich), fervidas a 98°C por 4min e submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida de 8-12% (SDS-PAGE)

(BioRad). Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose Amersham™ Protan™ Premium 0,45µm NC (GE HealthCare). Após transferência, as membranas foram bloqueadas em solução tamponada constituída de 5% leite desnatado em 1x TBST (3% de NaCl 5M; 10% TRIS 1M pH 7,5; 0,1% Tween), e então incubadas overnight a 4°C no mesmo tampão acrescidos dos seguintes anticorpos primários:

(i) anti-IL17RA (#12661, Cell Signaling Technology) – contra o receptor IL17RA;

(ii) anti-p-p44/42 MAPK (ERK1/2) (Thr202/Tyr204) (#9101), anti-p44/42 MAPK (ERK1/2) (#9102), anti-p-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) (#9251), anti-SAPK/JNK (#9252), anti-p-Erk5 (Thr218/Tyr220) (#3371), anti-Erk5 (#3372), p-NF-κB p65 (Ser536) (#3033), anti-NF-κB p65 (#8242), anti-p-IκBα (Ser32) (#2859), anti-IκBα (#4812) (todos da Cell Signaling Technology) – contra componentes das vias clássicas conhecidas *downstream* à IL17RA;

(iii) anti-p-RPS6 (Ser240/244) (#5364, Cell Signaling Technology), – contra um componente *downstream* da via mTORC1;

(iv) anti-Nestina (#MAB5326, Millipore), anti-SOX2 (#AB5603, Millipore), anti-SOX1 (#4194, Cell Signaling) – contra marcadores de NPCs;

(v) anti-SYN1 (#5297, Cell Signaling), anti-SYP (#ab32127, Abcam), anti-HOMER1 (#ab97593, Abcam), anti-TUJ1 (#T2200, Sigma Aldrich) e anti-MAP2 (#M9942, Sigma Aldrich) – contra marcadores estruturais de neurônios e de formação de sinapses;

(vi) anti-GFAP (#AB5408, Millipore) e anti-CD44 (#ab6124, Abcam) – contra marcadores de astrócitos;

(vii) anti-β-actina (#A1978, Sigma-Aldrich) e anti-GAPDH (#ab8245, Abcam) - foram utilizados como controles endógenos.

No dia seguinte, as membranas foram lavadas 3x com 1x TBST durante 10min e incubadas por 1h com anticorpos secundários anti-mouse-HRP (#7074) ou anti-rabbit-HRP (#7072) (ambos da Cell Signaling Technology) diluídos em solução 1x TBST com 5% de leite. Para revelação das bandas, as membranas foram incubadas em solução Clarity™ Western ECL Substrate (BioRad). As imagens foram geradas por quimioluminescência no aparelho ChemiDoc™ Imaging System (BioRad) e a intensidade de sinal emitido pelas bandas foi quantificada por densitometria pelo *software* Image Lab 5.2.1 (Bio-Rad).

2.7 Análise da proliferação celular

Para analisar o efeito da IL-17a sobre a proliferação das amostras de NPCs, as células foram plaqueadas na densidade de $1,5 \times 10^5$ células por poço em placas padrão de 12 poços (Sarstedt) quando foram mantidas por 24 e 48h em cultura, e na densidade de $2,5 \times 10^5$ na mesma placa quando foram mantidas por 72 e 144h em cultura. As amostras de NPCs foram cultivadas na presença de 10 e 50ng/mL de IL-17a, ou do veículo, ou de 20nM de rapamicina (controle negativo) por 24 e 48h. As amostras de NPCs foram também cultivadas na presença de 10 e 50ng/mL de IL-17a, ou do veículo, ou de 5nM de rapamicina (controle negativo), ou de 50ng/mL de IL-17a + 5nM de rapamicina por 72 e 144h. Após cada um desses períodos, as células foram tripsinizadas com o reagente Tryple Express 1x (ThermoFisher Scientific) por 2min a 37°C, ressuspensas em meio NB e centrifugadas a 1100rpm por 4min em temperatura ambiente. Após a centrifugação, o pellet de células foi ressuspendido em 1mL de NB, e uma alíquota dessa suspensão de células foi misturada com solução de *Trypan Blue Stain* 0,4% (1:1) e contadas pelo contador automático Countess® II FL Automated Cell Counter (ThermoFisher Scientific). Cada amostra foi contada em duplicata. Os resultados foram gerados a partir da quantidade de células viáveis, segundo o equipamento, por meio de média e desvio padrão das duplicatas e dos grupos.

2.8 Análise da migração celular pelo método da ferida e cicatrização

Para analisar o efeito da IL-17a sobre a migração das amostras de NPCs, foi realizado o método da ferida e cicatrização na monocamada de células (*scratch and wound healing assay*). Para tanto, as amostras de NPCs foram plaqueadas na densidade de $3,5 \times 10^4$ células por poço em placa de 96 poços do tipo Incucyte® ImageLock Plates (Essen Bioscience) previamente tratadas com poli-ornitina e laminina até atingirem confluência. Após esse período, uma ferida foi gerada de forma precisa e de mesmo tamanho simultaneamente em todos os poços com o auxílio do Incucyte® WoundMaker 96-well pin block (Essen Bioscience), e este foi considerado tempo “0h”. Após a ferida ser feita, o meio de crescimento das células foi substituído por meio NB sem os fatores de crescimento FGF e EGF (para que não houvesse proliferação celular)

e suplementado com 10 e 50ng/ml de IL-17a ou veículo até o fechamento da ferida. Cada condição experimental foi replicada 4 vezes.

O fechamento da ferida foi monitorado em tempo real com auxílio do microscópio óptico IncuCyte® ZOOM (Essen Bioscience) na objetiva 20x. Os dados foram analisados pelo módulo IncuCyte® *Scratch Wound Cell Migration* do software Incucyte® ZOOM Systems (Essen Bioscience). Os resultados foram expressos em porcentagem relativa da área da ferida no tempo analisado em relação ao tempo 0h (% *relative wound density*) para cada amostra e médias e desvios-padrão desses dados foram calculados entre os grupos.

2.9 Análise estatística

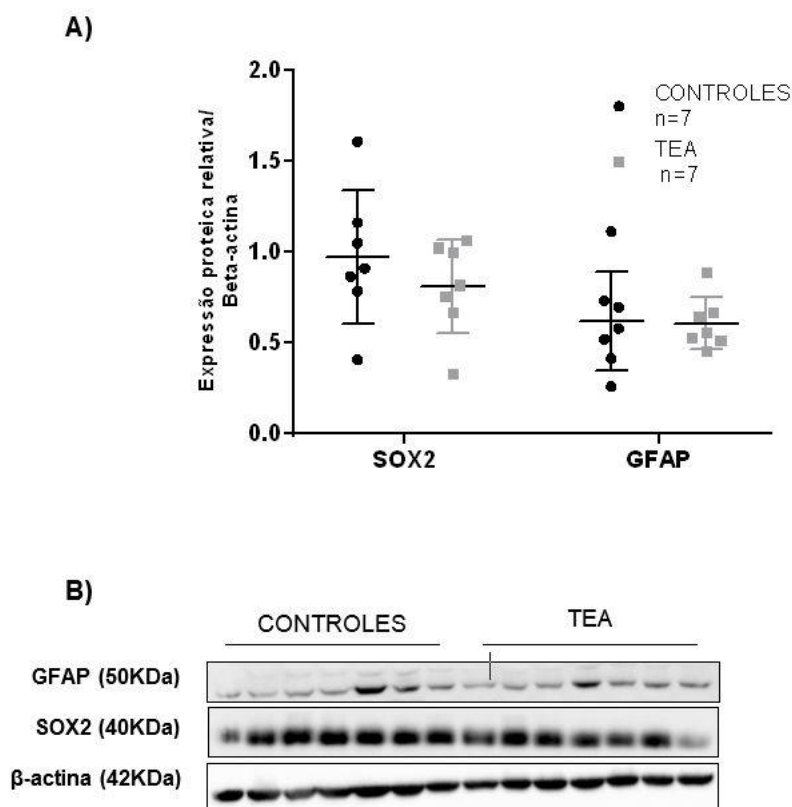
O software GraphPad Prism 7 foi utilizado para os testes estatísticos, aplicando-se teste *t* de Student ou Mann-Whitney para comparação entre dois grupos, e two-way-ANOVA ou Kruskal-Wallis para comparação de três ou mais grupos, com correção de Bonferroni ou Holm-Sidak, quando necessário. O valor-p estatisticamente significativo foi considerado igual ou menor que 0,05 ($p \leq 0,05$).

3 RESULTADOS

3.1 Caracterização das amostras de células neuroprogenitoras: análise da expressão de marcadores de células neurais e da glia

Devido ao fato do processo de diferenciação das linhagens de iPSCs para NPCs poder resultar em uma cultura mista de NPCs, neurônios e células da glia, nós analisamos em todas as amostras de NPCs derivadas de indivíduos controles e indivíduos com TEA a expressão proteica, por meio de *western blotting*, de: SOX2, um marcador de NPCs, MAP2, um marcador de neurônios, e GFAP, um marcador clássico de astrócitos, mas que também pode ser expresso por NPCs.⁽⁸⁷⁾

Observamos que as amostras de NPCs de ambos os grupos (controles e TEA) expressam SOX2, e que não há diferença significativa de expressão desse marcador entre as amostras de NPCs derivadas de indivíduos controles e com TEA (Figura 5A, B). Não detectamos expressão de MAP2 nas amostras de NPCs derivadas de ambos os grupos (dados não apresentados). Observamos também que as amostras de NPCs de ambos os grupos expressam um pouco de GFAP, e que não há diferença significativa de expressão desse marcador entre as amostras de NPCs derivadas de indivíduos controles e com TEA. Ainda, conforme o esperado, observamos que o nível de expressão de GFAP apresenta tendência a ser relativamente menor que o nível de expressão de SOX2 nas amostras de NPCs de ambos os grupos (Figura 5A, B). Esses resultados sugerem que as amostras de NPCs derivadas de indivíduos controles e com TEA constituem uma população relativamente semelhante e homogênea de células.



TEA: transtorno do espectro autista. **A)** Expressão proteica relativa de SOX2, marcador típico de NPCs, e de GFAP, marcador típico de astrócitos, nas amostras de NPCs derivadas de indivíduos controles (n=7) e indivíduos com TEA (n=7). Os níveis de expressão da proteína β -actina foram utilizados como controle endógeno. **B)** Imagem representativa de *western blotting* para detecção das proteínas GFAP, SOX2 e β -actina nas amostras de NPCs (15 μ g proteína, gel 8% poliacrilamida). Para a realização dos experimentos, foram utilizadas: amostras de NPCs derivadas de 5 indivíduos controles, sendo que para 3 indivíduos foram utilizadas amostras geradas de 1 clone de iPSCs e para 2 indivíduos foram utilizadas amostras geradas de 2 clones de iPSCs, totalizando 7 amostras de NPCs controles; amostras de NPCs geradas de 1 clone de iPSCs de 7 indivíduos com TEA, sendo 4 indivíduos com TEA idiopático e 3 indivíduos com TEA com mutação associada.

Figura 5. Expressão proteica constitutiva de SOX2 e GFAP nas amostras de células neuroprogenitoras

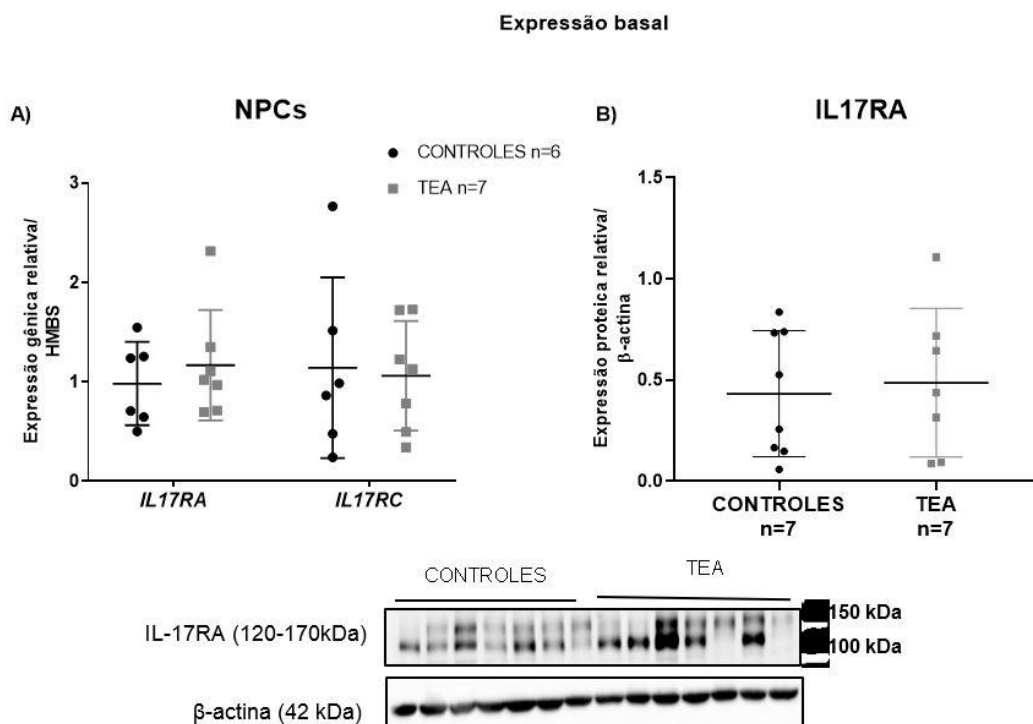
3.2 Expressão da IL17-a e de seu receptor nas amostras de células neuroprogenitoras, e efeito da IL-17a na expressão do receptor

Inicialmente, analisamos nas amostras de NPCs derivadas de indivíduos controles e com TEA a expressão endógena dos genes que codificam as citocinas IL-17a e IL-17f por RT-qPCR, assim como a secreção da proteína IL-17a para o meio de cultura pelo método de ELISA. Observamos que as amostras de NPCs não expressam constitutivamente os genes *IL-17a* e *IL-17f* (valores de expressão

indetectáveis ou muito próximos de zero quando comparados aos controles endógenos). De forma concordante, também não verificamos níveis detectáveis da IL-17a no meio de cultivo das amostras de NPCs (dados não apresentados). Esses resultados sugerem que as NPCs humanas em condições basais não expressam endogenamente IL-17a.

Em seguida, analisamos nas amostras de NPCs a expressão endógena do receptor de IL-17a por RT-qPCR e *western blotting*. Observamos que em todas as amostras de NPCs há expressão gênica constitutiva de ambas as subunidades do receptor (*IL17RA* e *IL17RC*) em níveis semelhantes entre os grupos controles e TEA (Figura 6A). Observamos também que em todas as amostras de NPCs há expressão proteica constitutiva de IL17RA em níveis semelhantes entre os grupos controles e TEA (Figura 6B, C). Ainda, quando separamos o grupo TEA em TEA idiopático e TEA mutação associada, também não observamos diferenças significativas na expressão constitutiva de IL17RA entre os grupos (dados não apresentados).

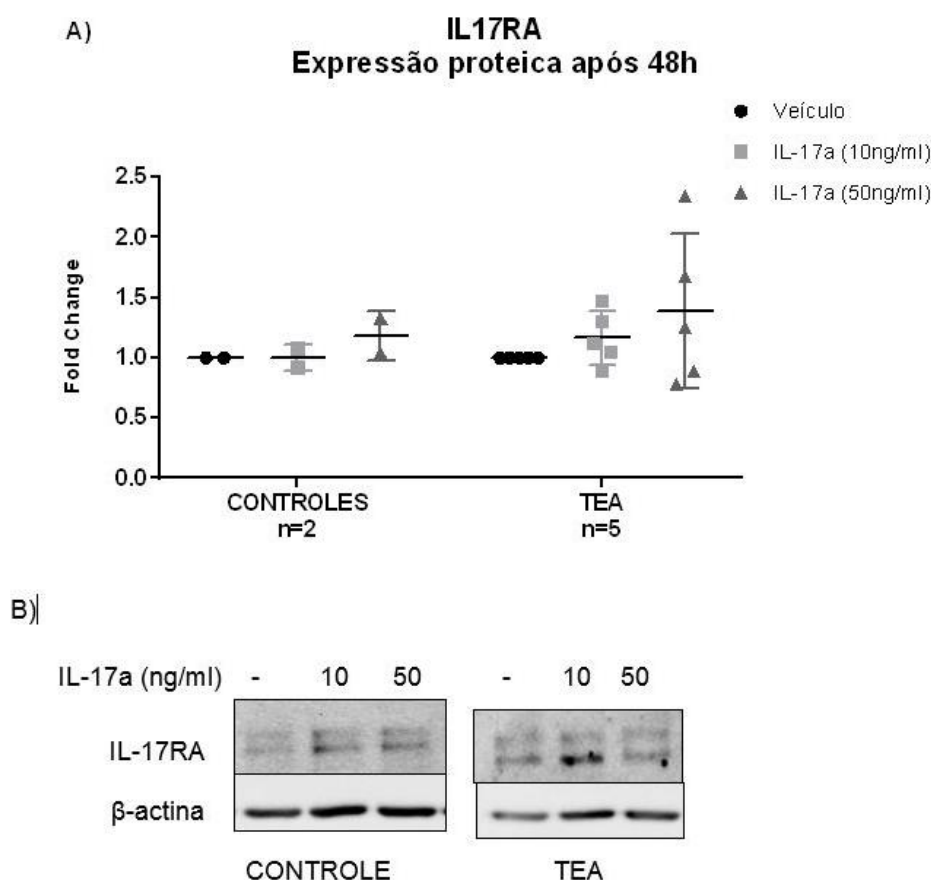
Em conjunto, esses resultados sugerem que as NPCs humanas expressam constitutivamente o receptor da IL-17a, apesar de não expressarem e secretarem constitutivamente IL-17a.



IL17RA: receptor de IL-17 subunidade A; IL17RC: receptor de IL-17 subunidade C; TEA: Transtorno do espectro autista. **A)** Expressão gênica relativa (valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$) de *IL17RA* e *IL17RC* nas amostras de NPCs derivadas de indivíduos controles (n=6) e indivíduos com TEA (n=7). Os níveis de *HMBS* foram utilizados como controle endógeno. Para a realização dos experimentos de análise da expressão gênica, foram utilizadas: amostras de NPCs derivadas de 5 indivíduos controles, sendo que para 4 indivíduos foram utilizadas amostras geradas de 1 clone de iPSCs, e para 1 indivíduo foram utilizadas amostras geradas de 2 clones de iPSCs, totalizando 6 amostras de NPCs controles; amostras de NPCs geradas de 1 clone de iPSCs de 7 indivíduos com TEA, sendo 4 indivíduos com TEA idiopático e 3 indivíduos com TEA com mutação associada. **B)** Gráfico da expressão proteica relativa de IL17RA nas amostras de NPCs derivadas de indivíduos controles (n=7) e de indivíduos com TEA (n=7). Os níveis de expressão da proteína β-actina foram utilizados como controle endógeno. **C)** Imagem representativa do *western blotting* para detecção de IL17RA e β-actina nas amostras de NPCs (15μg proteína, gel 8% poliacrilamida). Para a realização dos experimentos de análise da expressão proteica, foram utilizadas: amostras de NPCs derivadas de 5 indivíduos controles, sendo que para 4 indivíduos foram utilizadas amostras geradas de 1 clone de iPSCs, e para 2 indivíduos foram utilizadas amostras geradas de 2 clones de iPSCs, totalizando 7 amostras de NPCs controles; amostras de NPCs geradas de 1 clone de iPSCs de 7 indivíduos com TEA, sendo 4 indivíduos com TEA idiopático e 3 indivíduos com TEA com mutação associada.

Figura 6. Expressão gênica e proteica constitutiva de IL17RA/C nas amostras de células neuroprogenitoras

Verificamos também por meio de *western blotting* se o tratamento das amostras de NPCs com IL-17a (10 e 50ng/mL) ou veículo por 48h altera a expressão do receptor IL17RA. Observamos que o tratamento com IL-17a não modificou significativamente os níveis de expressão proteica de IL17RA nos grupos controles e TEA quando comparado ao veículo (Figura 7A, B). Ainda, quando separamos o grupo TEA em TEA idiopático e TEA mutação associada, também não observamos efeitos significativos da IL-17a sobre a expressão de IL17RA (dados não apresentados).



TEA: transtorno do espectro autista; IL-17a: interleucina 17a; IL17RA: receptor de IL-17 subunidade A. **A)** *Fold change* da expressão proteica de IL17RA nas amostras de NPCs derivadas de indivíduos controles (n=2) e indivíduos com TEA (n=5) após tratamento das células com IL-17a (10 e 50ng/mL) em relação ao tratamento com veículo (água ultrapura). Os níveis de expressão da proteína β-actina foram utilizados como controle endógeno. **B)** Imagem representativa do *western blotting* para detecção de IL17RA e β-actina nas amostras de NPCs após o tratamento com IL-17a nos dois grupos estudados (15μg proteína, gel 8% poliácridamida). Para a realização dos experimentos, foram utilizadas: amostras de NPCs geradas de 1 clone de iPSCs de 2 indivíduos controles; amostras de NPCs geradas de 1 clone de iPSCs de 5 indivíduos com TEA, sendo 3 indivíduos com TEA idiopático e 2 indivíduos com TEA com mutação associada.

Figura 7. Expressão de IL17RA nas amostras de células neuroprogenitoras após tratamento com IL-17a por 48h

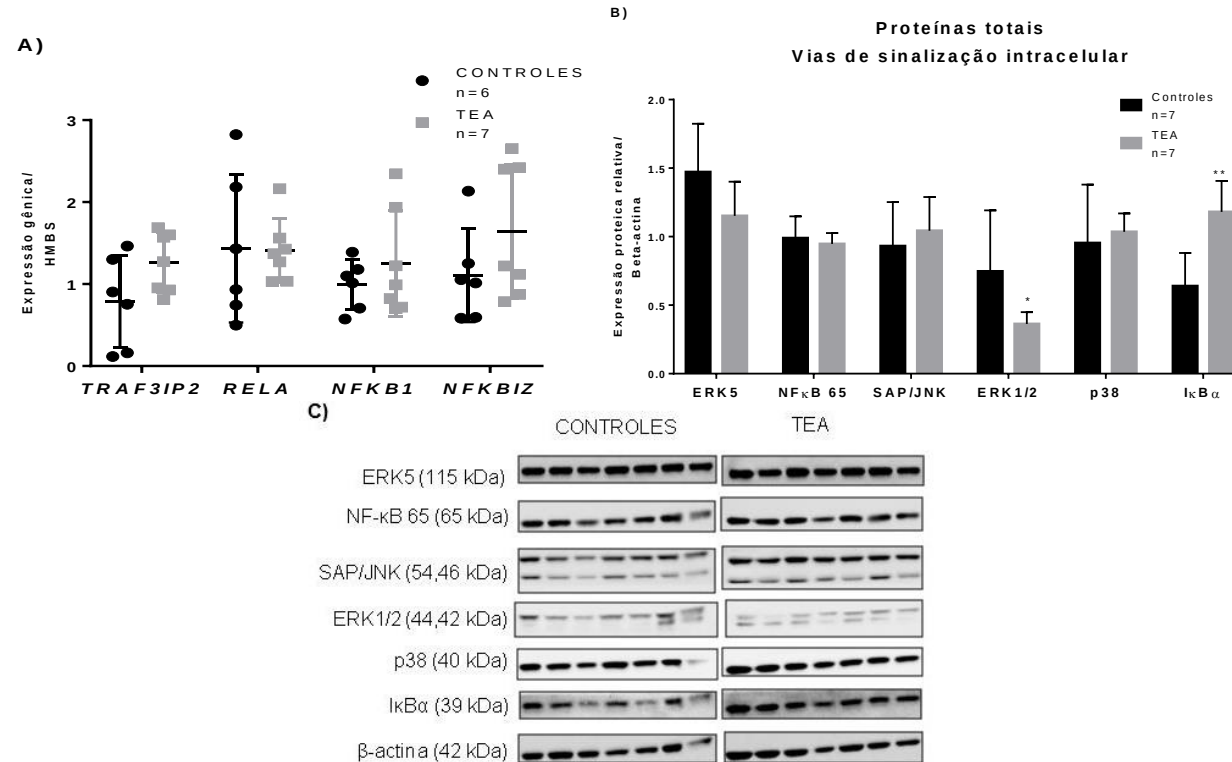
3.3 Expressão de componentes das vias de sinalização intracelular ativadas pela IL-17a nas amostras de células neuroprogenitoras

Analizamos por meio de RT-qPCR a expressão constitutiva de genes que codificam componentes-chave de vias de sinalização intracelular ativadas por IL-17a nas amostras de NPCs derivadas de indivíduos controles e com TEA. Observamos que

em todas as amostras de NPCs analisadas não há expressão gênica constitutiva de *CEPBD* (que codifica a proteína CEBP-delta) (dados não apresentados), mas que há expressão gênica constitutiva de *TRAF3IP2* (que codifica a proteína ACT1), *RELA* (que codifica NFκB-p65), *NKFB1* (que codifica NFκB-p50) e *NFKBIZ* (que codifica IκBζ), e que não há diferença significativa na expressão desses genes entre os grupos controles e TEA (Figura 8A). Ainda, quando separamos o grupo TEA em TEA idiopático e TEA mutação associada, também não observamos diferenças significativas na expressão constitutiva desses genes entre os grupos (dados não apresentados).

Analizamos também por meio de *western blotting* a expressão constitutiva de proteínas-chave de vias de sinalização intracelular ativadas por IL-17a nas amostras de NPCs derivadas de indivíduos controles e com TEA. Detectamos a expressão das proteínas ERK5, NFκB-p65, SAP/JNK, ERK1/2, p38 e IκBα, e observamos que não há diferença significativa na expressão constitutiva das proteínas ERK5, NFκB-p65, SAP/JNK e p38 entre os grupos controles e TEA (Figura 8B, C). Por outro lado, observamos que os níveis de expressão de ERK1/2 são significativamente menores nas amostras de NPCs do grupo TEA em relação ao grupo controles ($p \leq 0,05$), e que os níveis de expressão de IκBα são significativamente maiores nas amostras de NPCs do grupo TEA em relação ao grupo controles ($p \leq 0,01$) (Figura 8B, C). Ainda, quando separamos o grupo TEA em TEA idiopático e TEA mutação associada, também observamos as mesmas tendências (dados não apresentados).

Esses resultados sugerem que as NPCs humanas expressam endogenamente componentes de diferentes vias de sinalização intracelular ativadas pela IL-17a, e que as quinases ERK1/2, da família das MAPKs, e a proteína IκBα, que controla a atividade dos fatores de transcrição NF-κB, podem ser reguladas de forma diferente nas amostras de NPCs derivadas de indivíduos com TEA.



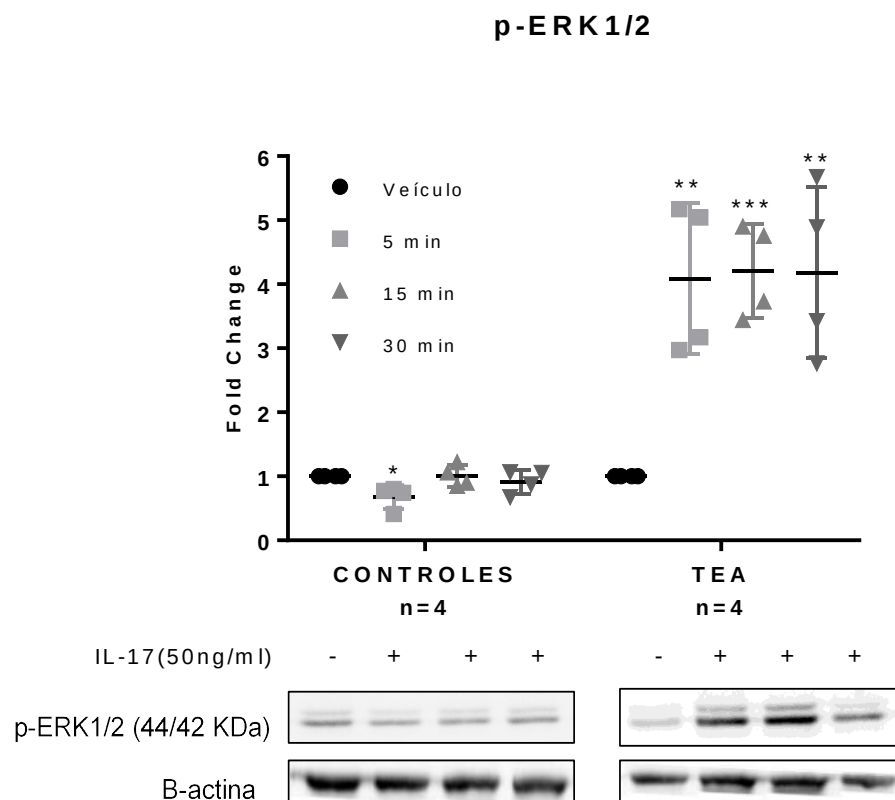
TEA: transtorno do espectro autista. **A)** Expressão relativa dos genes *TRAF3IP2*, *RELA*, *NFKB1* e *NFKBIZ* e nas amostras de NPCs derivadas de indivíduos controles (n=6) e indivíduos com TEA (n=7). Os níveis de *HMBs* foram utilizados como controle endógeno. Para a realização dos experimentos de análise da expressão gênica, foram utilizadas: amostras de NPCs derivadas de 5 indivíduos controles, sendo que para 4 indivíduos foram utilizadas amostras geradas de 1 clone de iPSCs, e para 1 indivíduo foram utilizadas amostras geradas de 2 clones de iPSCs, totalizando 6 amostras de NPCs controles; amostras de NPCs geradas de 1 clone de iPSCs de 7 indivíduos com TEA, sendo 4 indivíduos com TEA idiopático e 3 indivíduos com TEA com mutação associada. **B)** Expressão relativa das proteínas ERK5, NFκB65, SAP/JNK, ERK1/2, p38 e IκBα nas amostras de NPCs derivadas de indivíduos controles (n=7) e indivíduos com TEA (n=7). Os níveis de expressão da proteína β-actina foram utilizados como controle endógeno. *p≤0,05, ** p ≤0,01. **C)** Imagem representativa do *western blotting* para detecção de ERK5, NFκB65, SAP/JNK, ERK1/2, p38, IκBα e β-actina nas amostras de NPCs dos dois grupos estudados (15μg de proteína, gel 10% poli-acrilamida). Para a realização dos experimentos de análise da expressão proteica, foram utilizadas: amostras de NPCs derivadas de 5 indivíduos controles, sendo que para 4 indivíduos foram utilizadas amostras geradas de 1 clone de iPSCs, e para 2 indivíduos foram utilizadas amostras geradas de 2 clones de iPSCs, totalizando 7 amostras de NPCs controles; amostras de NPCs geradas de 1 clone de iPSCs de 7 indivíduos com TEA, sendo 4 indivíduos com TEA idiopático e 3 indivíduos com TEA com mutação associada.

Figura 8. Expressão gênica e proteica constitutiva de componentes das vias de sinalização intracelular ativadas por IL-17a nas amostras de células neuroprogenitoras

3.4 Vias de sinalização intracelular ativadas pela IL-17a nas amostras de células neuroprogenitoras

Verificamos quais das vias de sinalização intracelular clássicas são ativadas pela IL-17a nas amostras de NPCs derivadas de indivíduos controles e com TEA por meio de um experimento de *time course* e da quantificação por *western blotting* dos níveis de fosforilação de componentes dessas vias, tais como p-ERK5, p-NFκB-p65, p-SAP/JNK, p-ERK1/2, p-P38, p-IKβα. Ainda, verificamos se a IL-17a ativa a via mTORC1 por meio da quantificação dos níveis de fosforilação de p-RPS6, componente *downstream* ao complexo mTORC1.

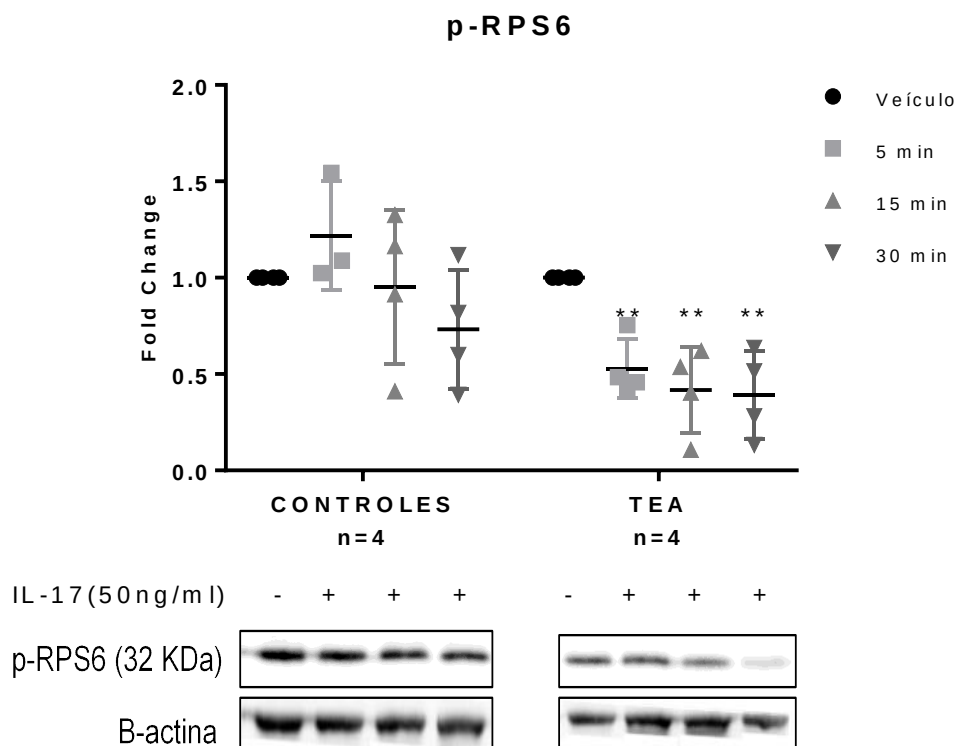
Observamos que o tratamento com IL-17a (50ng/mL) diminuiu significativamente os níveis de p-ERK1/2 nas amostras de NPCs do grupo controles após 5 minutos de tratamento ($p \leq 0,05$), enquanto aumentou de forma significativa em até 5x os níveis de fosforilação de p-ERK1/2 nas amostras de NPCs do grupo TEA após 5, 15 e 30 minutos de tratamento quando comparado ao veículo ($p \leq 0,01$ - $p \leq 0,001$) (Figura 9). A mesma tendência foi observada quando separamos o grupo TEA em TEA idiopático e TEA mutação associada (dados não apresentados). Como havíamos observado menor expressão de ERK1/2 (proteína total) nas amostras de NPCs do grupo TEA, estamos, no momento, repetindo esses experimentos para analisar a expressão de ERK1/2 e normalizar os dados de expressão de pERK1/2 com os dados de ERK1/2.



Fold change da expressão proteica relativa de p-ERK1/2 após tratamento das amostras de NPCs derivadas de indivíduos controles (n=4) e indivíduos com TEA (n=4) com IL-17a (50ng/mL) por 5, 15 e 30 min em relação ao tratamento com veículo (água ultrapura). Os níveis de expressão da proteína β -actina foram utilizados como controle endógeno. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$. Abaixo do gráfico estão as imagens representativas do *western blotting* para detecção de p-ERK1/2 e β -actina em cada grupo (10 μ g proteína, gel 10% poliacrilamida). Para a realização dos experimentos, foram utilizadas: amostras de NPCs geradas de 1 clone de iPSCs de 4 indivíduos controles; amostras de NPCs geradas de 1 clone de iPSCs de 4 indivíduos com TEA, sendo 2 indivíduos com TEA idiopático e 2 indivíduos com TEA com mutação associada.

Figura 9. Perfil de ativação de pERK1/2 nas amostras de células neuroprogenitoras após tratamento com IL-17a

Observamos também que o tratamento com IL-17a (50ng/mL) não modificou significativamente os níveis de p-RPS6 nas amostras de NPCs do grupo controles, enquanto diminuiu significativamente em até 50% os níveis de p-RPS6 nas amostras de NPCs do grupo TEA após 5, 15 e 30 minutos de tratamento quando comparado ao veículo ($p \leq 0,01$) (Figura 10). A mesma tendência foi observada quando separamos o grupo TEA em TEA idiopático e TEA mutação associada (dados não apresentados).



Fold change da expressão proteica relativa de p-RPS6 após tratamento das amostras de NPCs derivadas de indivíduos controles (n=4) e indivíduos com TEA (n=4) com IL-17a (50ng/mL) por 5, 15 e 30min em relação ao tratamento com veículo (água ultrapura). Os níveis de expressão da proteína β -actina foram utilizados como controle endógeno. ** $p \leq 0,01$. Abaixo do gráfico estão as imagens representativas do *western blotting* para detecção de p-RPS6 e β -actina em cada grupo (10 μ g proteína, gel 10% poliacrilamida). Para a realização dos experimentos, foram utilizadas: amostras de NPCs geradas de 1 clone de iPSCs de 4 indivíduos controles; amostras de NPCs geradas de 1 clone de iPSCs de 4 indivíduos com TEA, sendo 2 indivíduos com TEA idiopático e 2 indivíduos com TEA com mutação associada. **Figura 10.** Perfil de ativação de pRPS6 nas amostras de células neuroprogenitoras após tratamento com IL-17a

Esses resultados sugerem que as vias de sinalização ERK1/2 e mTORC1 são moduladas de maneira diferente nas amostras de NPCs do grupo controles quando comparadas as amostras de NPCs do grupo TEA, e podem estar envolvidas em possíveis fenótipos celulares alterados dessas células após tratamento com IL-17a.

Detectamos também nas amostras de NPCs de ambos os grupos expressão baixa de p-ERK5 após tratamento com IL-17a, mas os experimentos de *western blotting* não ficaram muito bons e estão sendo padronizados. Curiosamente, não detectamos expressão de p-NF κ B-p65 nas amostras de NPCs de ambos os grupos, embora expressão dessa proteína tenha sido detectada nas amostras de astrócitos humanos que utilizamos como controles positivos (Apêndice 1). Esses resultados

sugerem que a IL-17a isoladamente parece não ativar de forma efetiva p-NF κ B-p65 nas NPCs humanas. Por fim, mesmo após diversas tentativas, não tivemos sucesso em detectar expressão de p-SAP/JNK, p-P38 e p-IK β tanto nas amostras de NPCs como nas amostras de astrócitos humanos e células HEK293 irradiadas com luz UV que utilizamos como controles positivos (dados não apresentados), o que sugere que os anticorpos que dispomos contra essas proteínas fosforiladas não funcionam muito bem para *western blotting*. Assim sendo, não temos ainda como afirmar se essas vias são ou não ativadas nas amostras de NPCs humanas após tratamento com IL-17a.

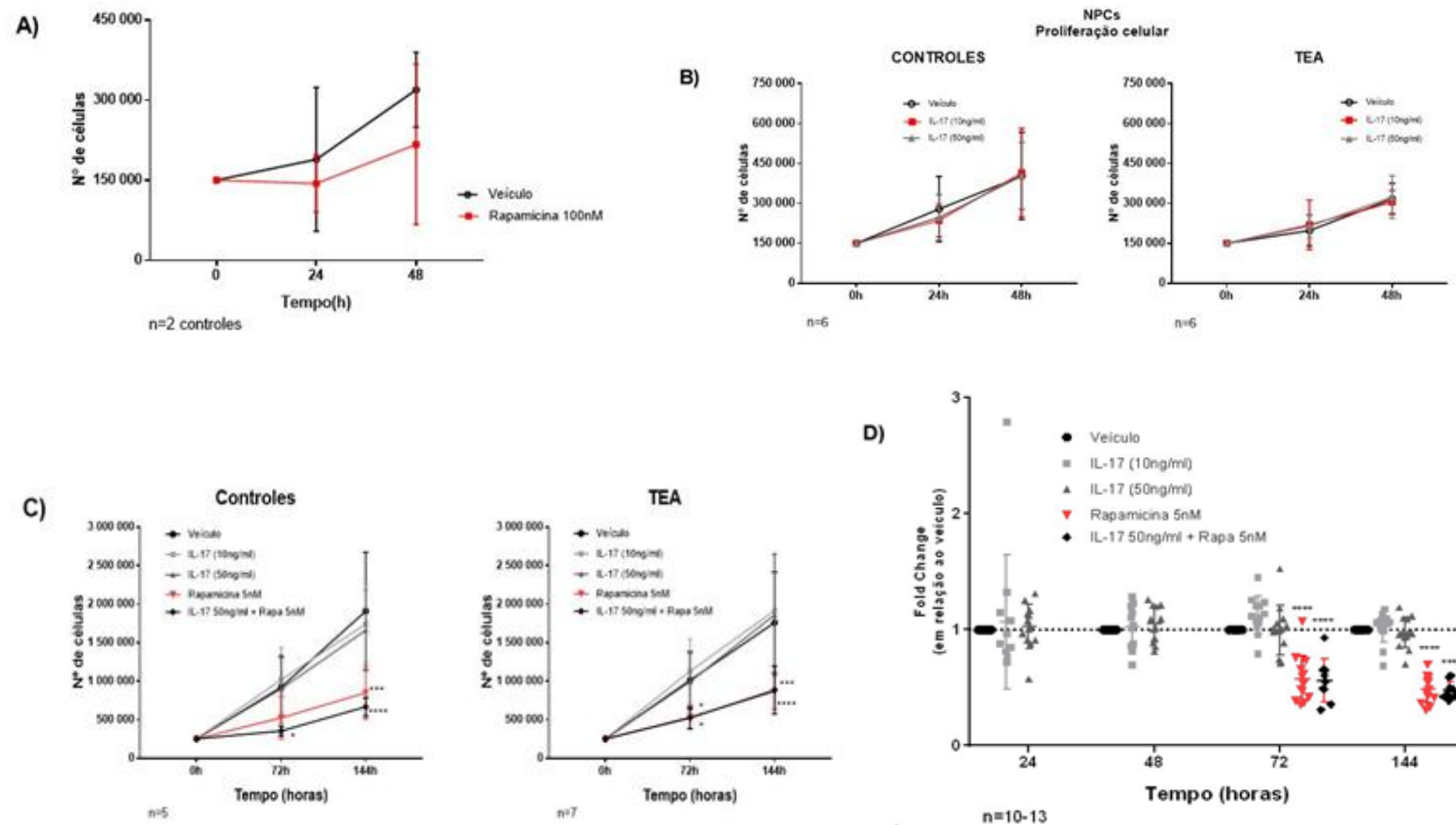
3.5 Efeito da IL-17a na proliferação das amostras de células neuroprogenitoras

Analizamos também o efeito da IL-17a na proliferação das amostras de NPCs derivadas de indivíduos controles e com TEA pela metodologia de contagem automatizada por exclusão de azul de tripan. Realizamos essa análise por meio de dois experimentos independentes, sendo que no primeiro as amostras de NPCs foram cultivadas na presença da IL-17a (10 e 50ng/mL) ou veículo por um período de 24 a 48 horas. Utilizamos como controle do experimento o antibiótico rapamicina (20nM), que sabidamente inibe a proliferação das NPCs. Observamos que o tratamento com rapamicina de fato inibiu a proliferação das NPCs quando comparado ao veículo (Figura 11A). Observamos também que, sob nossas condições experimentais, o tratamento com IL-17a não teve efeito significativo na proliferação das amostras de NPCs tanto do grupo controles como do grupo TEA quando comparado ao veículo (Figura 11B). O resultado foi o mesmo quando separamos o grupo TEA em TEA idiopático e TEA mutação associada (dados não apresentados).

No segundo experimento, as amostras de NPCs foram cultivadas na presença da IL-17a (10 e 50ng/mL) ou veículo por um período mais prolongado de 72 a 144 horas. Utilizamos como controle do experimento a rapamicina (5nM) isoladamente ou em conjunto com a IL-17a (50ng/mL). Observamos que o tratamento com rapamicina isoladamente ou em conjunto com a IL-17a inibiu de forma significativa a proliferação das NPCs quando comparado ao veículo ($p \leq 0,01$ - $p \leq 0,001$). Por outro lado, observamos que o tratamento mais prolongado apenas com a IL-17a continuou não tendo efeito significativo na proliferação das amostras de NPCs tanto do grupo controles como do grupo TEA quando comparado ao veículo (Figura 11C). O resultado foi o mesmo quando

separamos o grupo TEA em TEA idiopático e TEA mutação associada (dados não apresentados). Cabe ressaltar ainda que as amostras de NPCs de ambos os grupos apresentam um padrão de proliferação muito semelhante em condições basais (sem IL-17a) em todos os períodos analisados (Apêndice 2).

Como uma outra forma de mostrar os resultados acima, a Figura 11D compila todas as amostras e os todos os tempos de tratamento (24-144h) e mostra os valores de *fold change* do número de células após tratamento com IL-17a, rapamicina e rapamicina + IL-17a em relação ao número de células após tratamento com veículo. Em conjunto, esses resultados sugerem que a IL-17a isoladamente não tem efeito sobre a proliferação das NPCs humanas.



A) Número absoluto de células das amostras de NPCs derivadas de indivíduos controles (n=2) após tratamento com o fármaco rapamicina (20nM) ou com veículo (água ultrapura) por 24 e 48h. Método de contagem automatizada por exclusão de azul de tripan 0,4%. Plaqueamento inicial: 150.000 células. Para a realização dos experimentos com rapamicina, foram utilizadas amostras de NPCs geradas de 1 clone de iPSCs de 2 indivíduos controles. **B)** Gráfico do número absoluto de células das amostras de NPCs derivadas de indivíduos controles (n=6) e indivíduos com TEA (n=6) após tratamento com IL-17a (10 e 50ng/mL) ou veículo (água ultrapura) por 24 e 48h. Método de contagem automatizada por exclusão de azul de tripan 0,4%. Plaqueamento inicial: 150.000 células. Para a realização dos experimentos com IL-17a, foram utilizadas: amostras de NPCs derivadas de 6 indivíduos controles, sendo que para 4 indivíduos foram utilizadas amostras geradas de 1 clone de iPSCs, e para 1 indivíduo foram utilizadas amostras geradas de 2 clones de iPSCs, totalizando 6 amostras de NPCs controles; amostras de NPCs geradas de 1 clone de iPSCs de 6 indivíduos com TEA, sendo 3 indivíduos com TEA idiopático e 3 indivíduos com TEA

continua...

...continuação

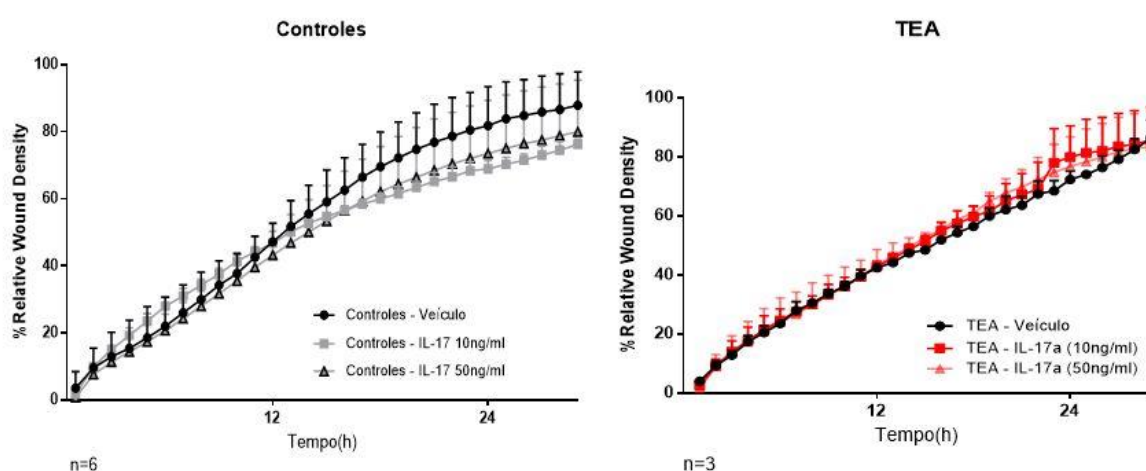
com mutação associada. **C)** Gráfico do número absoluto de células das amostras de NPCs derivadas de indivíduos controles (n=5) e indivíduos com TEA (n=7) após tratamento com IL-17a (10 e 50ng/mL), rapamicina (5nM), rapamicina (5nM) + IL-17a (50ng/mL), ou veículo (água ultrapura) por 72 e 144h. Método de contagem automatizada por exclusão de azul de tripan 0,4%. Plaqueamento inicial: 250.000 células. Para a realização dos experimentos foram utilizadas: amostras de NPCs derivadas de 5 indivíduos controles, sendo que para 3 indivíduos foram utilizadas amostras geradas de 1 clone de iPSCs, e para 1 indivíduo foram utilizadas amostras geradas de 2 clones de iPSCs, totalizando 5 amostras de NPCs controles; amostras de NPCs geradas de 1 clone de iPSCs de 7 indivíduos com TEA, sendo 4 indivíduos com TEA idiopático e 3 indivíduos com TEA com mutação associada. *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$. **D)** Gráfico compilado do *fold change* do número de células após tratamento das amostras de NPCs derivadas de indivíduos controles (n=5-6) e indivíduos com TEA (n=6-7) com IL-17a (10ng/mL e 50ng/mL) em relação ao número de células após tratamento com veículo (água ultrapura) por 0, 24, 48, 72 e 144h. Os valores de *fold change* do número de células após tratamento das amostras de NPCs com rapamicina (5nM) e rapamicina (5nM) + IL-17a (50ng/mL) em relação ao número de células após tratamento com veículo (água ultrapura) por 72 e 144h também estão mostrados. **** $p \leq 0,0001$.

Figura 11. Proliferação das amostras de células neuroprogenitoras após tratamento com IL-17a por 24h até 144h

3.6 Efeito da IL-17a na migração das amostras de células neuroprogenitoras

Verificamos o efeito da IL-17a na migração das amostras de NPCs derivadas de indivíduos controles e com TEA por meio do ensaio da ferida e cicatrização na monocamada de células (*scratch and wound healing assay*). Observamos que, sob nossas condições experimentais, o tratamento com IL-17a (10 e 50ng/mL) não teve efeito significativo na migração das NPCs tanto do grupo controles como do grupo TEA quando comparado ao veículo. Observamos também que as NPCs de ambos os grupos apresentam um padrão de migração muito semelhante em condições basais (sem IL-17a) (Figura 12).

Esses resultados sugerem que a IL-17a isoladamente parece não ter efeito sobre a migração das NPCs humanas.



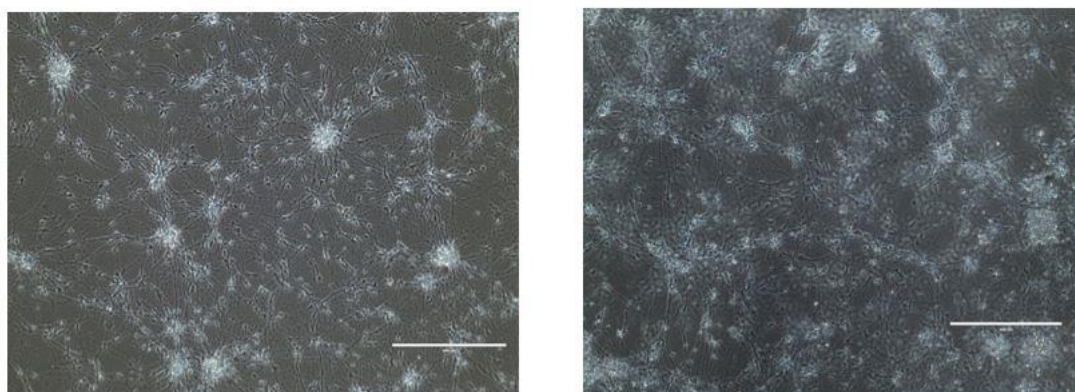
Porcentagem relativa da área da ferida na monocamada das amostras de NPCs derivadas de indivíduos controles (n=6) e indivíduos com TEA (n=3) no tempo analisado em relação ao tempo 0h (% *relative wound density*) após tratamento com IL-17a (10 e 50ng/mL) ou veículo (água ultrapura) por 28h. Para a realização dos experimentos, foram utilizadas: amostras de NPCs derivadas de 5 indivíduos controles, sendo que para 4 indivíduos foram utilizadas amostras geradas de 1 clone de iPSCs, e para 1 indivíduo foram utilizadas amostras geradas de 2 clones de iPSCs, totalizando 6 amostras de NPCs controles; amostras de NPCs geradas de 1 clone de iPSCs de 3 indivíduos com TEA, sendo 2 indivíduos com TEA idiopático e 1 indivíduo com TEA com mutação associada.

Figura 12. Migração das amostras de células neuroprogenitoras após tratamento com IL-17a

3.7 Efeito da IL-17a na diferenciação neuronal das amostras de células neuroprogenitoras

Por fim, analisamos o efeito da IL-17a na diferenciação das amostras de NPCs derivadas de indivíduos controles e com TEA para neurônios. Realizamos essa análise por meio de dois experimentos independentes, sendo que no primeiro as amostras de NPCs foram cultivadas em meio de indução neuronal na presença da IL-17a (10ng/mL) ou veículo por um período de 14 dias, e no segundo experimento as amostras de NPCs foram cultivadas em meio de indução neuronal na presença de uma concentração maior da IL-17a (50ng/mL) ou veículo por um período de 21 dias.

Observamos que após 14 e 21 dias do protocolo de diferenciação neuronal, todas as amostras de células adquiriram um formato alongado e ficaram cheias de neuritos, morfologia típica de neurônios em cultura (Figura 13). De forma geral, não observamos diferenças grosseiras e detectáveis em microscopia de fase na morfologia das amostras de neurônios derivados de indivíduos controles e com TEA.



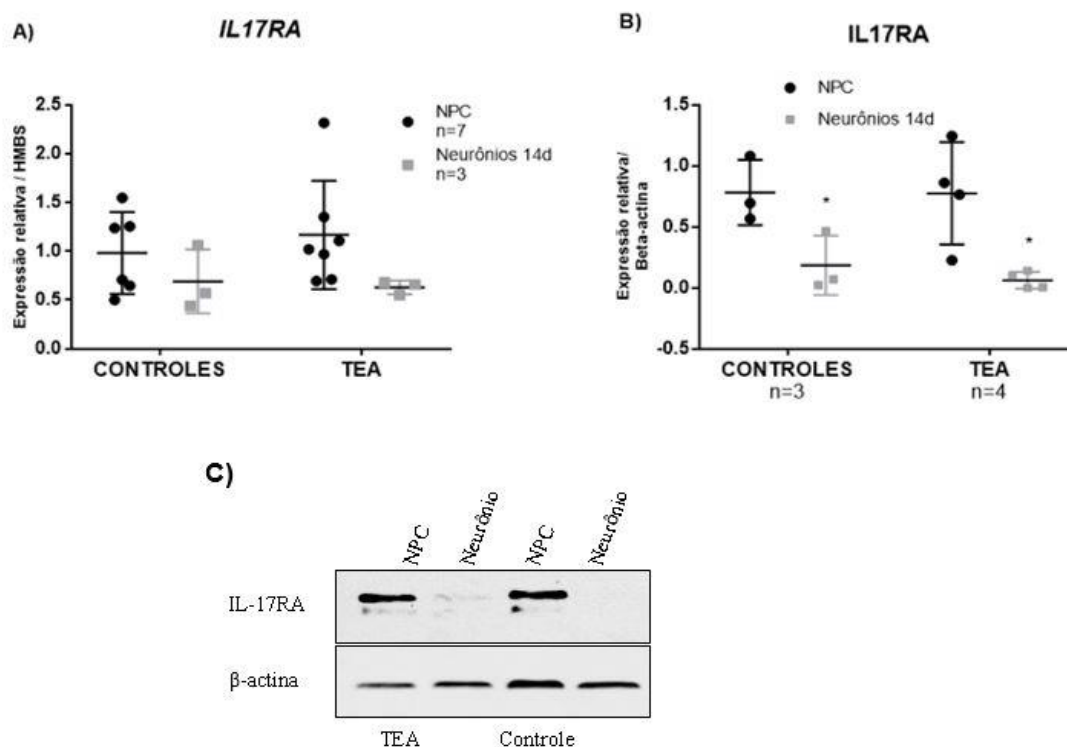
Aumento 10x.

Figura 13. Imagem representativa de microscopia óptica por contraste de fase mostrando os neurônios jovens de 14 dias à esquerda e em 21 dias à direita

No primeiro experimento (14 dias de diferenciação), inicialmente comparamos a expressão constitutiva do receptor da IL-17a entre as amostras de NPCs e neurônios que denominamos “jovens” por RT-qPCR e *western blotting*. Observamos níveis semelhantes de expressão gênica constitutiva de *IL17RA* entre as amostras de NPCs e neurônios jovens de ambos os grupos analisados (Figura 14A). Contudo, observamos que a expressão proteica de IL17RA é significativamente menor nos neurônios jovens em comparação com as NPCs de ambos os grupos analisados (Figura

14B, C). Observamos também que a expressão de IL17RA nos neurônios jovens não mudou com o tratamento com IL-17a (dados não apresentados). Ainda não sabemos ao certo qual o significado biológico dessa diminuição de expressão proteica de IL17RA nas amostras de neurônios jovens quando comparadas as NPCs.

Expressão basal

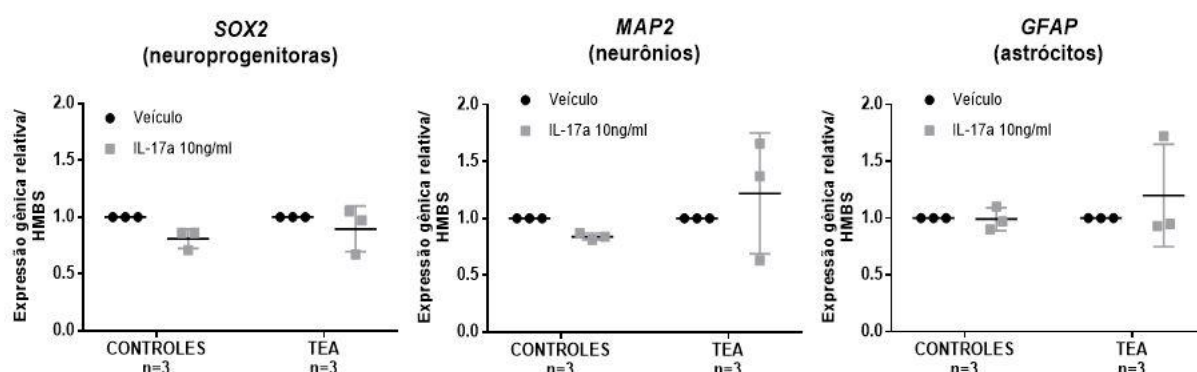


A) Expressão gênica relativa (valores de $2^{-\Delta\Delta C_t}$) de *IL17RA* nas amostras de NPCs e neurônios jovens derivados de indivíduos controles e indivíduos com TEA (n=7 em cada grupo de amostras de NPCs e n=3 em cada grupo de amostras de neurônios jovens). Os níveis de *HMBS* foram utilizados como controle endógeno. Para a realização dos experimentos de análise da expressão gênica, foram utilizadas: amostras de NPCs derivadas de 5 indivíduos controles, sendo que para 4 indivíduos foram utilizadas amostras geradas de 1 clone de iPSCs, e para 2 indivíduos foram utilizadas amostras geradas de 2 clones de iPSCs, totalizando 7 amostras de NPCs controles; amostras de NPCs geradas de 1 clone de iPSCs de 7 indivíduos com TEA, sendo 4 indivíduos com TEA idiopático e 3 indivíduos com TEA com mutação associada; amostras de neurônios jovens gerados de 1 clone de iPSCs de 3 indivíduos controles; amostras de neurônios jovens gerados de 1 clone de iPSCs de 3 indivíduos com TEA, sendo 2 indivíduos com TEA idiopático e 1 indivíduo com TEA com mutação associada. **B)** Gráfico da expressão proteica relativa de *IL17RA* nas amostras de NPCs e neurônios jovens derivados de indivíduos controles e indivíduos com TEA (n=3 em cada grupo de amostras de NPCs e n=4 em cada grupo de amostras de neurônios jovens). **C)** Imagem representativa do *western blotting* para detecção de *IL17RA* e β -actina nas amostras de NPCs e neurônios jovens (20 μ g proteína, gel 8% poliacrilamida). Para a realização dos experimentos de análise da expressão proteica, foram utilizadas: amostras de NPCs geradas de 1 clone de iPSCs de 3 indivíduos controles; amostras de NPCs geradas de 1 clone de iPSCs de 3 indivíduos com TEA, sendo 2 indivíduos com TEA idiopático e 1 indivíduo com TEA com mutação associada; amostras de neurônios jovens gerados de 1 clone de iPSCs de 3 indivíduos controles; amostras de neurônios jovens gerados de 1 clone de iPSCs de 4 indivíduos com TEA, sendo 2 indivíduos com TEA idiopático e 2 indivíduo com TEA com mutação associada.

Figura 14. Comparação da expressão gênica e proteica constitutiva de *IL17RA* entre as amostras de células neuroprogenitoras e neurônios jovens derivados das células neuroprogenitoras

Quantificamos também nas amostras de neurônios jovens após 14 dias de tratamento com IL-17a ou veículo a expressão gênica de marcadores de NPCs (*SOX2*), neurônios (*MAP2*) e astrócitos (*GFAP*) por meio de RT-qPCR. Observamos que

o tratamento com IL-17a não alterou a expressão de *SOX2*, *MAP2* e de *GFAP* tanto nas amostras de neurônios do grupo controles como do grupo TEA quando comparado ao veículo (Figura 15). A mesma tendência foi observada quando separamos o grupo TEA em TEA idiopático e TEA mutação associada (dados não apresentados).

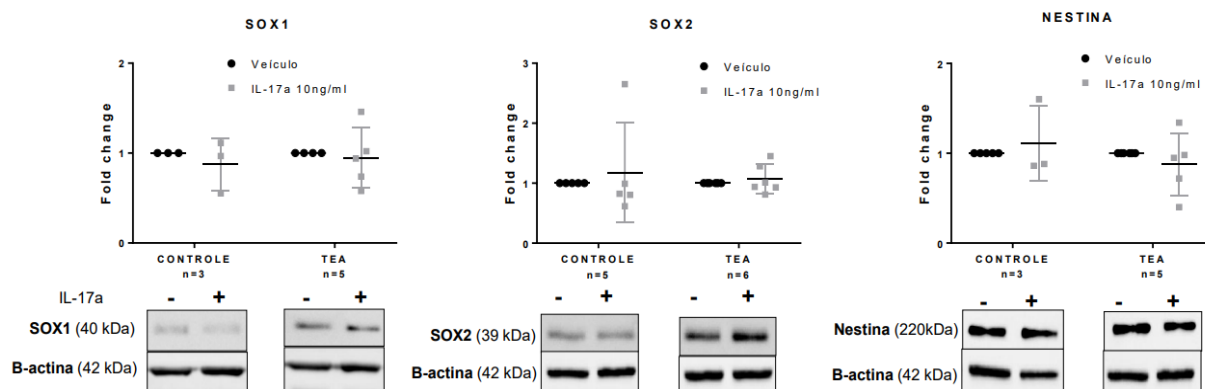


Fold change da expressão gênica relativa (valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$) de marcadores de NPCs (*SOX2*), neurônios (*MAP2*) e astrócitos (*GFAP*) nas amostras de neurônios jovens derivados de indivíduos controles (n=3) e indivíduos com TEA (n=3) após indução da diferenciação neuronal e tratamento com IL-17a (10ng/mL) por 14 dias em relação ao tratamento com veículo (água ultrapura). Os níveis de HMBS foram utilizados como controle endógeno. Para a realização dos experimentos, foram utilizadas: amostras de NPCs geradas de 1 clone de iPSCs de 3 indivíduos controles; amostras de NPCs geradas de 1 clone de iPSCs de 3 indivíduos com TEA, sendo 2 indivíduos com TEA idiopático e 1 indivíduo com TEA com mutação associada.

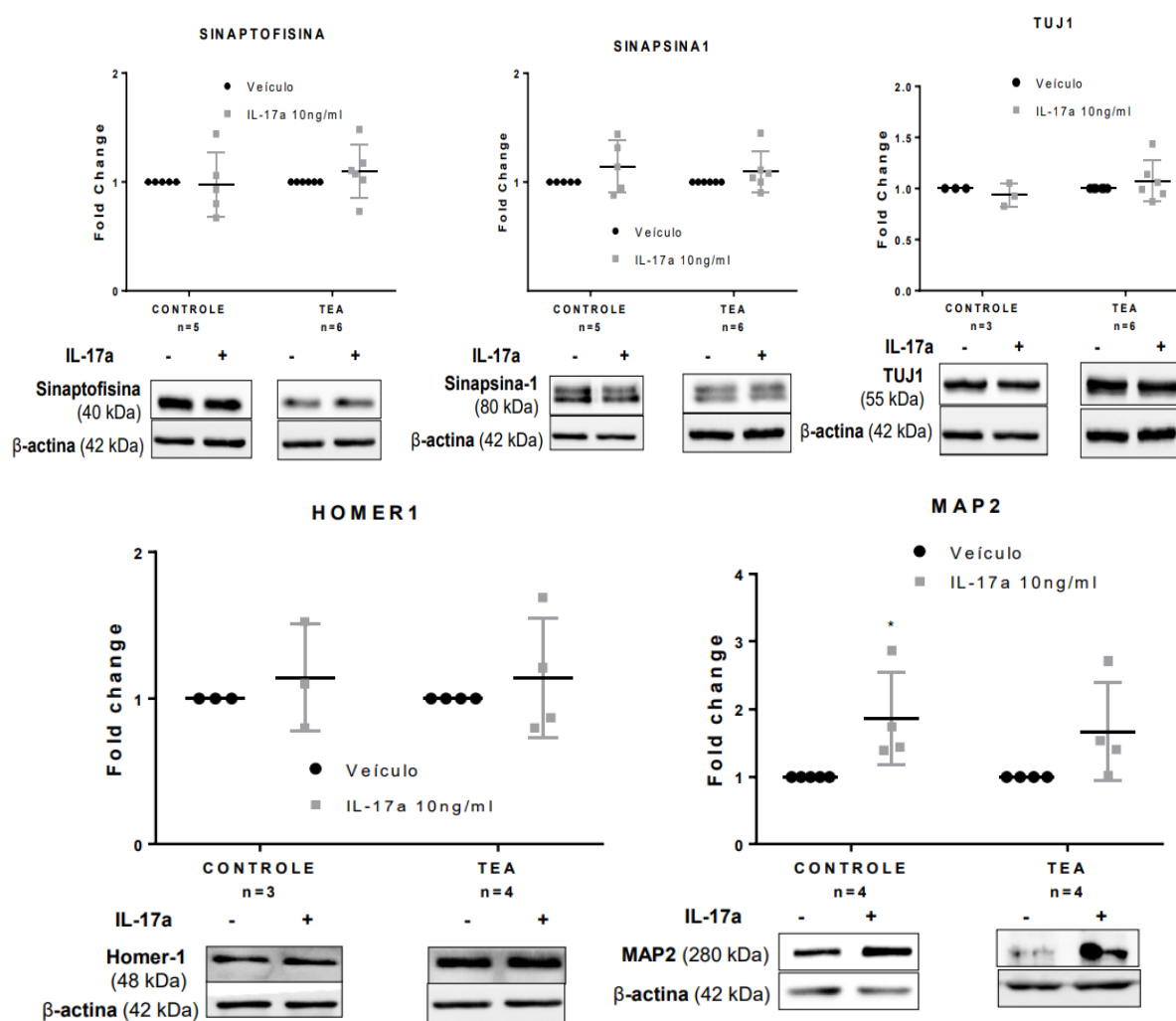
Figura 15. Expressão gênica relativa de marcadores de células neuroprogenitoras, neurônios e astrócitos nas amostras de neurônios jovens após tratamento com IL-17a durante o período de neurodiferenciação

Em seguida, quantificamos nas amostras de neurônios jovens após 14 dias de tratamento com IL-17a ou veículo a expressão proteica de um número maior de marcadores de NPCs (*SOX1*, *SOX2* e *NESTINA*), neurônios (*SINAPTOFISINA*, *SINAPSINA1*, *TUJ1*, *HOMER* e *MAP2*) e astrócitos (*GFAP*) por *western blotting*. Observamos que o tratamento com IL-17a não alterou de forma significativa a expressão de *SOX1*, *SOX2* e *NESTINA* (Figura 16A), de *SINAPTOFISINA*, *SINAPSINA1*, *TUJ1* e *HOMER* (Figura 16B), e de *GFAP* (Figura 16C) nas amostras de neurônios jovens tanto do grupo controles como do grupo TEA quando comparado ao veículo. Por outro lado, observamos que o tratamento com IL-17a aumentou significativamente os níveis de expressão da proteína *MAP2* nas amostras de neurônios jovens do grupo controles ($p \leq 0,05$) e provocou uma tendência a aumentar a expressão dessa proteína nas amostras de neurônios jovens do grupo TEA quando comparados ao veículo (Figura 16B). O resultado foi o mesmo quando separamos o grupo TEA em TEA idiopático e TEA mutação associada (dados não apresentados).

A) NEUROPROGENITORAS

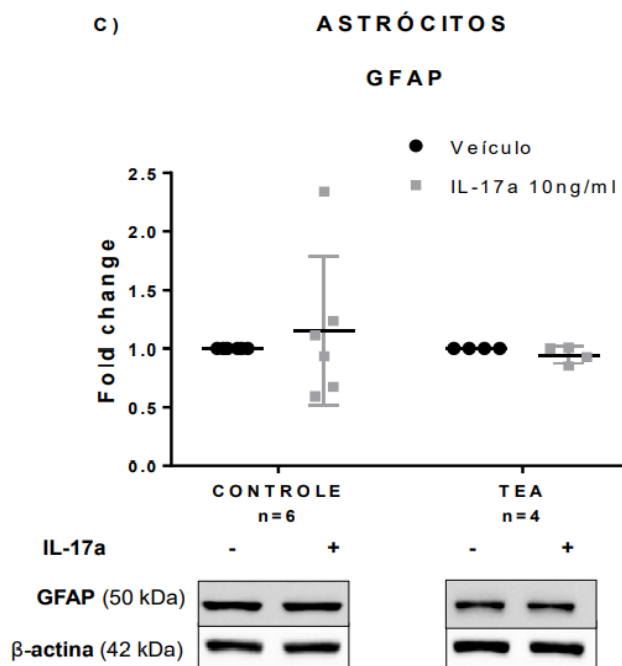


B) NEURÔNIOS



continua...

...continuação



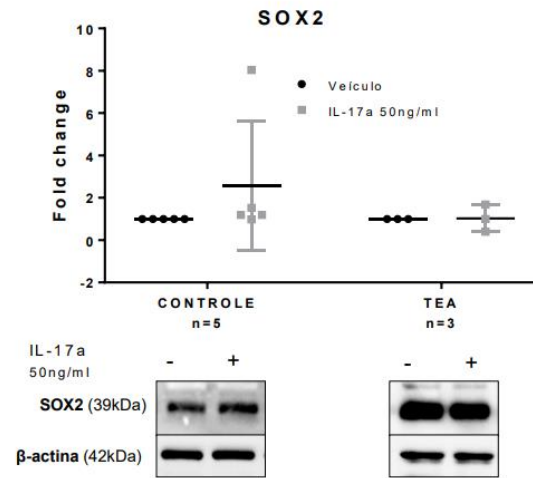
TEA: transtorno do espectro autista; IL-17a: interleucina 17a. **A-C)** Fold change da expressão proteica relativa de marcadores de NPCs, neurônios jovens e astrócitos nas amostras de neurônios jovens derivados de indivíduos controles e com TEA após indução da diferenciação neuronal e tratamento com IL-17a (10ng/mL) por 14 dias em relação ao tratamento com veículo (água ultrapura). **A)** SOX1 (controles: n=3; TEA: n=5) - foram utilizadas amostras de neurônios jovens geradas de 1 clone de iPSCs de 3 indivíduos controles; amostras de neurônios jovens geradas de 1 clone de iPSCs de 5 indivíduos com TEA, sendo 4 indivíduos com TEA idiopático e 1 indivíduo com TEA com mutação associada. SOX2 (controles: n=5; TEA: n=6) - foram utilizadas: amostras de neurônios jovens derivadas de 1 clone de iPSCs de 5 indivíduos controles; amostras de neurônios jovens geradas de 1 clone de iPSCs de 6 indivíduos com TEA, sendo 4 indivíduos com TEA idiopático e 2 indivíduos com TEA com mutação associada. NESTINA (controles: n=3; TEA: n=5) - foram utilizadas: amostras de neurônios jovens geradas de 1 clone de iPSCs de 3 indivíduos controles; amostras de neurônios jovens geradas de 1 clone de iPSCs de 5 indivíduos com TEA, sendo 3 indivíduos com TEA idiopático e 2 indivíduos com TEA com mutação associada. **B)** SINAPTOFISINA (controles: n=5; TEA: n=6) foram utilizadas: amostras de neurônios jovens geradas de 1 clone de iPSCs de 5 indivíduos controles; amostras de neurônios jovens geradas de 1 clone de iPSCs de 6 indivíduos com TEA, sendo 3 indivíduos com TEA idiopático e 3 indivíduos com TEA com mutação associada. SINAPSINA1 (controles: n=5; TEA n=6) - foram utilizadas: amostras de neurônios jovens derivadas de 1 clone de iPSCs de 5 indivíduos controles; amostras de neurônios jovens geradas de 1 clone de iPSCs de 6 indivíduos com TEA, sendo 3 indivíduos com TEA idiopático e 3 indivíduos com TEA com mutação associada. TUJ1 (controles: n=3; TEA: n=6) - foram utilizadas: amostras de neurônios jovens geradas de 1 clone de iPSCs de 3 indivíduos controles; amostras de neurônios jovens geradas de 1 clone de iPSCs de 6 indivíduos com TEA, sendo 4 indivíduos com TEA idiopático e 2 indivíduos com TEA com mutação associada. HOMER1: (controles: n=3; TEA: n=4) - foram utilizadas: amostras de neurônios jovens geradas de 1 clone de iPSCs de 3 indivíduos controles; amostras de neurônios jovens geradas de 1 clone de iPSCs de 4 indivíduos com TEA, sendo 2 indivíduos com TEA idiopático e 2 indivíduos com TEA com mutação associada. MAP2 (controles: n=4; TEA: n=4) - foram utilizadas: amostras de neurônios jovens derivados de 1 clone de iPSCs de 4 indivíduos controles; amostras de neurônios jovens geradas de 1 clone de iPSCs de 4 indivíduos com TEA, sendo 3 indivíduos com TEA idiopático e 1 indivíduo com TEA com mutação associada. *p<0,05. **C)** GFAP (controles: n=6; TEA: n=4) - foram utilizadas: amostras de neurônios jovens derivados de 1 clone de iPSCs de 4 indivíduos controles; amostras de neurônios jovens geradas de 1 clone de iPSCs de 4 indivíduos com TEA, sendo 2 indivíduos com TEA idiopático e 2 indivíduos com TEA com mutação associada. Abaixo de cada gráfico estão as imagens representativas do *western blotting* para detecção das proteínas analisadas em cada grupo. Os níveis de expressão da proteína β-actina foram utilizados como controle endógeno (10μg de proteínas, gel 10% poliacrilamida).

Figura 16. Expressão proteica relativa de marcadores de células neuroprogenitoras, neurônios e astrócitos nas amostras de neurônios imaturos após tratamento com IL-17a durante o período de neurodiferenciação

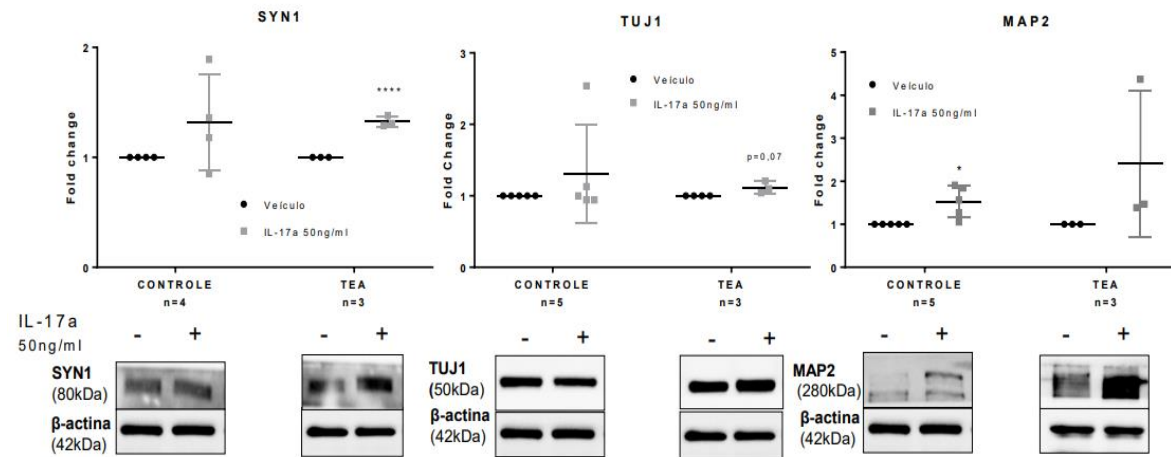
A proteína MAP2 (*microtubule associated protein 2*) é uma proteína do citoesqueleto associada aos microtúbulos que parece desempenhar função importante na reunião e estabilização dos microtúbulos, o que é um passo essencial nos processos de neurogênese e manutenção da morfologia neural. A maior expressão de MAP2 nas amostras de neurônios jovens após tratamento com IL-17a pode sugerir que essa citocina estimula a diferenciação ou maturação neural das NPCs. Contudo, não observamos alteração da expressão dos outros marcadores de neurônios analisados. Assim sendo, consideramos importante estender essa investigação mudando um pouco o desenho experimental.

No segundo experimento, quantificamos nas amostras de neurônios que denominamos ‘intermediários’ após 21 dias de tratamento com IL-17a ou veículo a expressão proteica de marcadores de NPCs (SOX2), neurônios (SINAPSINA1, TUJ1, MAP2) e astrócitos (GFAP) por *western blotting*. Observamos que o tratamento com IL-17a não alterou de forma significativa a expressão de SOX2, GFAP e TUJ1 quando comparado ao veículo (Figura 17A, B e C). Por outro lado, observamos que o tratamento com IL-17a aumentou significativamente os níveis de expressão da proteína MAP2 nas amostras de neurônios intermediários do grupo controles ($p \leq 0,05$) e provocou uma tendência a aumentar a expressão dessa proteína nas amostras de neurônios intermediários do grupo TEA quando comparado ao veículo, assim como aumentou significativamente os níveis de expressão da proteína SINAPSINA1 nas amostras de neurônios intermediários do grupo TEA ($p \leq 0,001$) e provocou uma tendência a aumentar a expressão dessa proteína nas amostras de neurônios intermediários do grupo controles quando comparado ao veículo (Figura 17B). A proteína SINAPSINA1 se associa a vesículas sinápticas e está envolvida com a formação de sinapses e liberação de neurotransmissores.

A) Neuroprogenitoras

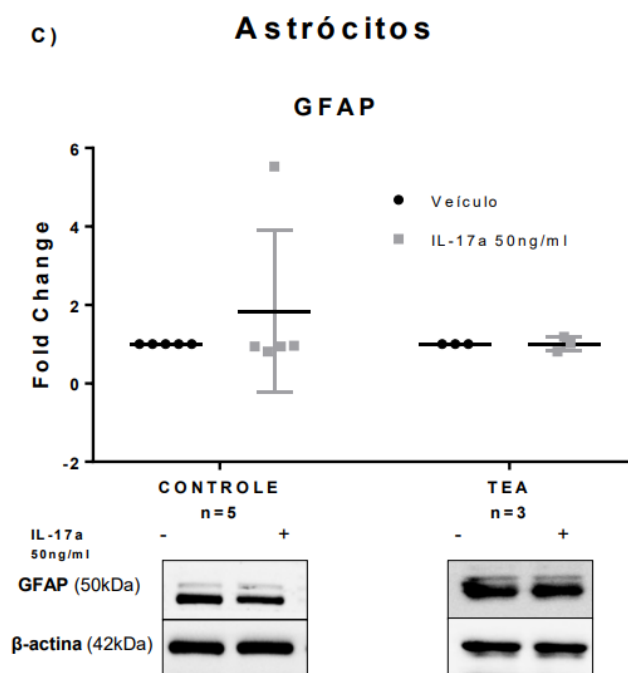


B) Neurônios



continua...

...continuação



TEA: transtorno do espectro autista; IL-17a: interleucina 17a. **A-C)** Fold change da expressão proteica relativa de marcadores de NPCs, neurônios e astrócitos nas amostras de neurônios intermediários derivados de indivíduos controles e com TEA após indução da diferenciação neuronal e tratamento com IL-17a (50ng/mL) por 21 dias em relação ao tratamento com veículo (água ultrapura). **A)** SOX2 (controles: n=5; TEA: n=3) - foram utilizadas: amostras de neurônios intermediários geradas de 1 clone de iPSCs de 5 indivíduos controles; amostras de neurônios intermediários geradas de 1 clone de iPSCs de 3 indivíduos com TEA idiopático. **B)** SINAPSINA1 (controles: n=4; TEA: n=3) - foram utilizadas: amostras de neurônios intermediários geradas de 1 clone de iPSCs de 4 indivíduos controles; amostras de neurônios intermediários geradas de 1 clone de iPSCs de 3 indivíduos com TEA idiopático. TUJ1: (controles: n=5; TEA: n=3) foram utilizadas: amostras de neurônios intermediários geradas de 1 clone de iPSCs de 5 indivíduos controles; amostras de neurônios geradas de 1 clone de iPSCs de 3 indivíduos com TEA idiopático. MAP2 (controles=5; TEA n=3) - foram utilizadas: amostras de neurônios intermediários geradas de 1 clone de iPSCs de 5 indivíduos controles; amostras de neurônios intermediários geradas de 1 clone de iPSCs de 3 indivíduos com TEA idiopático. * $p \leq 0,05$, **** $p \leq 0,001$. **C)** GFAP (controles: n=5; TEA: n=3) - foram utilizadas: amostras de neurônios intermediários geradas de 1 clone de iPSCs de 5 indivíduos controles; amostras de neurônios intermediários geradas de 1 clone de iPSCs de 3 indivíduos com TEA idiopático. Abaixo de cada gráfico estão as imagens representativas do *western blotting* para detecção das proteínas analisadas em cada grupo. Os níveis de expressão da proteína β-actina foram utilizados como controle endógeno (10μg de proteínas, gel 10% poliacrilamida).

Figura 17. Expressão proteica relativa de marcadores de células neuroprogenitoras, neurônios e astrócitos nas amostras de neurônios de 21 dias após tratamento com IL-17a durante o período de neurodiferenciação

Esses resultados sugerem que a IL-17a parece de fato estimular a diferenciação ou maturação neural das NPCs humanas. Estamos, no momento, analisando a expressão de outros marcadores neuronais (tais como SINAPTOFISINA, HOMER, PSD95) e do receptor de IL-17 (IL-17RA) – visto que em 14 dias de diferenciação neuronal, essas células quase não expressavam esse receptor - nessas mesmas amostras de neurônios intermediários, assim como realizando novas diferenciações das amostras de NPCs para neurônios intermediários e mais maduros

(com 30-45 dias de diferenciação) para analisar o efeito da IL-17a na quantidade de neuritos e de sinapses (por meio de experimentos de imunofluorescência) e na funcionalidade dos neurônios (por meio de experimentos de influxo de cálcio e eletrofisiologia ou marcadores de atividade neuronal/ativação de potencial de ação por meio do marcador c-Fos, por exemplo).

4 DISCUSSÃO

Exposição pré-natal à MIA tem sido apontada como um fator de risco ambiental ao TEA, e estudos recentes, sobretudo com modelos murinos, têm mostrado que aumento inadequado da interleucina IL-17a no encéfalo em desenvolvimento da prole durante a MIA constitui um dos fatores contribuintes das alterações cerebrais e comportamentais do TEA. Contudo, o conhecimento sobre as células-alvo da IL-17a no encéfalo, assim como sobre as alterações celulares e moleculares que essa citocina induz durante o neurodesenvolvimento ainda é escasso, principalmente em relação ao neurodesenvolvimento humano.

O presente projeto teve como objetivos explorar os efeitos da IL-17a isoladamente (na ausência de outras citocinas pró-inflamatórias) sobre NPCs humanas geradas a partir de células-tronco pluripotentes induzidas derivadas de indivíduos com TEA e controles neurotípicos. Como comentado na introdução, essas células apresentam um perfil de expressão gênica com identidade de células presentes no córtex cerebral no primeiro trimestre gestacional humano,⁽⁷⁸⁾ momento em que infecções maternas que ativam de forma importante o sistema imune podem oferecer mais risco de desenvolvimento do TEA na prole.⁽²⁵⁾ Exploramos o efeito da IL-17a sobre a expressão de seu receptor, assim como sobre a ativação de vias de sinalização intracelular nas NPCs. Exploramos também os efeitos da IL-17a sobre a proliferação, a migração e a diferenciação neuronal das NPCs. Por fim, exploramos se o efeito dessa citocina é diferente entre as NPCs derivadas de indivíduos com TEA e controles.

Inicialmente, analisamos os níveis de expressão gênica e proteica constitutiva da IL-17a e de seu receptor (IL17RA/C) nas NPCs humanas. Observamos que as NPCs, em condições normais e “não-inflamatórias”, não expressam e secretam níveis detectáveis da IL-17a, mas expressam constitutivamente o receptor IL17RA/C e, conseqüentemente, são potenciais alvos dessa citocina. Esses resultados são concordantes com os achados de Li et al.⁽⁴⁹⁾ e Liu et al.⁽⁸⁸⁾ que mostraram expressão do receptor de IL-17a em NPCs murinas. Esses resultados são concordantes também com os achados de Choi et al.,⁽⁴⁶⁾ que não detectaram mRNA de IL-17a no encéfalo da prole murina de MIA no período de desenvolvimento E14,5 (momento no qual a ação da IL-17a foi mais significativa no modelo de MIA), sugerindo que essa citocina não é produzida localmente neste período e é proveniente, pelo menos inicialmente, da

circulação sanguínea materna. Também não observamos diferença de expressão de IL17RA/C entre as amostras de NPCs provenientes de indivíduos com TEA e controles, o que sugere que possíveis efeitos diferenciais da IL-17a entre as NPCs de indivíduos com TEA e controles não devem ser provenientes da expressão constitutiva diferencial de IL17RA/C.

Observamos também que o tratamento das NPCs humanas com a IL-17a por 48h não alterou de forma significativa a expressão do receptor IL17RA. Choi et al.⁽⁴⁶⁾ haviam inicialmente observado aumento de expressão de IL17RA no encéfalo fetal em E14,5, 2 dias após a indução de MIA (injeção de polyI:C em E12,5), e um artigo publicado posteriormente do mesmo grupo mostrou que a expressão aumentada de IL17RA vinha sobretudo de neurônios pós-mitóticos presentes no encéfalo em desenvolvimento, mas não de NPCs.⁽⁴⁷⁾ Assim, nossos resultados corroboram com esses achados de que o aumento da expressão de IL17RA observado no encéfalo da prole de MIA não é proveniente de NPCs.

Em seguida, analisamos a expressão constitutiva de genes (*TRAF3IP2*, *RELA*, *NFKB1*, *NFKBIZ*, *CEPBD*) e proteínas (ERK5, NFκB-p65, SAP/JNK, ERK1/2, p38 e IKBα) pertencentes a vias de sinalização intracelular clássicas ativadas por IL-17a nas amostras de NPCs provenientes de indivíduos com TEA e controles. Observamos que todas as amostras de NPCs expressam endogenamente todos os genes e proteínas analisadas. Observamos também que nas NPCs de indivíduos com TEA a expressão das proteínas quinases ERK1/2 da família das MAPKs é significativamente menor e que a expressão da proteína IKBα, que se associa aos fatores de transcrição NF-κB, é significativamente maior que em comparação com as NPCs de indivíduos controles. Analisamos também quais vias de sinalização intracelular são moduladas pela IL-17a nas amostras de NPCs provenientes de indivíduos com TEA e controles. Curiosamente, observamos que nas amostras de NPCs de indivíduos com TEA a IL-17a ativa de forma muito mais intensa e significativa as proteínas pERK1/2, e inibe de forma muito mais intensa e significativa a proteína pRPS6 da via de sinalização mTORC1. Estudos prévios com outros tipos celulares cerebrais mostraram que a IL-17a aumenta a diferenciação de células progenitoras de oligodendrócitos murinas *in vitro* por meio do aumento de ERK1/2,⁽⁸⁹⁾ e estimula autofagia de neurônios corticais por meio da diminuição da via mTORC1 em modelo murino de isquemia.⁽⁹⁰⁾ Ainda, ambas as vias ERK1/2^(91,92) e mTORC1^(93,94) têm sido associadas a diversos processos do neurodesenvolvimento e da cognição, tais como neurogênese, migração neuronal,

arborização de neuritos e formação de sinapses. Não sabemos explicar com os resultados que temos até o momento quais são as consequências funcionais para as NPCs da menor expressão das proteínas ERK1/2 e da maior expressão da proteína IKB α , nem quais são as consequências do efeito antagônico da IL-17a sobre a atividade das vias ERK1/2 e mTORC1, mas nossos resultados sugerem que essas vias podem estar envolvidas com possíveis fenótipos anormais induzidos pela IL-17a nas NPCs de indivíduos com TEA.

Observamos também que a IL-17a parece modular a ativação de pERK5 nas amostras de NPCs, mesmo que de maneira residual. Contudo, como os experimentos de *western blotting* contra p-ERK5 não ficaram com uma qualidade muito boa para serem quantificáveis, seria necessário repetir esse ensaio com anticorpos de melhor qualidade. Também não tivemos sucesso na detecção das proteínas p-SAP/JNK, p-P38 e p-IKB α com os anticorpos que dispomos no laboratório e, por esse motivo, não sabemos ainda se essas vias de sinalização são ativas nas NPCs humanas. Por fim, não detectamos ativação de p-NFkB-p65 nas amostras de NPCs humanas. De qualquer forma, é interessante notar que a modulação da atividade de algumas vias de sinalização *downstream* à IL-17a, como NF-KB por exemplo, pode ser, muitas vezes, modesta, podendo necessitar de moléculas sinérgicas para ser vista.⁽⁹⁵⁾

Analizamos o efeito da IL-17a sobre a proliferação das NPCs humanas, e observamos que, sob nossas condições experimentais, essa citocina não alterou a proliferação das amostras de NPCs provenientes de indivíduos com TEA e controles. Esses resultados são discordantes dos achados de Li et al.⁽⁴⁹⁾ e Tfilin et al.⁽⁵⁰⁾ que observaram que o tratamento com IL-17a (5-100ng/mL) por 2 a 4 dias diminuiu a proliferação de NPCs *in vitro* derivadas de embriões de camundongos em E14 ou de camundongos recém-nascidos.

Analizamos o efeito da IL-17a sobre a migração das NPCs humanas, e observamos que, sob nossas condições experimentais, essa citocina também não alterou a migração das amostras de NPCs provenientes de indivíduos com TEA e controles. Não encontramos na literatura científica estudos que descrevam a ação da IL-17a sobre a migração de NPCs especificamente. Choi et al.⁽⁴⁶⁾ mostraram que a administração da IL-17a nos ventrículos cerebrais de embriões de camundongos em E14,5 levou à desorganização da citoarquitetura laminar do córtex cerebral e à diminuição da espessura cortical, o que sugere que essa citocina possa ter efeito sobre a migração neuronal. Cabe ressaltar também um artigo recente que mostrou que a

administração da IL-17a nos ventrículos cerebrais de embriões de camundongos em E14,5 levou à ativação e a alterações na migração da micróglia.⁽⁹⁶⁾ Assim, pode ser a IL-17a tenha um efeito mais efetivo sobre a migração de neurônios maduros e da micróglia, e não tenha efeito efetivo sobre a migração de NPCs. Ainda, pode ser que exista a necessidade da presença de outras citocinas e de um ambiente mais inflamatório para que ocorra alteração de migração das NPCs induzida por IL-17a. Para confirmar a ausência de efeito da IL-17a sobre a migração de NPCs humanas, estamos planejando aumentar o tamanho amostral e/ou realizar experimentos que medem a migração dessas células de forma diferente dos que realizamos.

Por fim, analisamos o efeito da IL-17a sobre a diferenciação neuronal das NPCs humanas, e observamos que, sob nossas condições experimentais, essa citocina aumentou de forma significativa a expressão do marcador de neurônios MAP2 nas amostras de neurônios jovens (após 14 dias de diferenciação) derivados de indivíduos controles e provocou uma tendência a aumentar a expressão dessa proteína nas amostras de neurônios jovens de indivíduos com TEA. Resultado semelhante foi também observado nas amostras de neurônios intermediários (após 21 dias de diferenciação) de ambos os grupos. Ainda, observamos que o tratamento com IL-17a também aumentou de forma significativa a expressão da proteína SINAPSINA1 nas amostras de neurônios intermediários do grupo TEA e provocou uma tendência a aumentar a expressão dessa proteína nas amostras de neurônios intermediários do grupo controles. Esses resultados sugerem que a IL-17a tem potencial de aumentar a diferenciação ou a maturação neuronal de NPCs humanas e, de certa forma, são concordantes com os achados de Tfilin et al.⁽⁵⁰⁾ que observaram que o tratamento de neuroesferas de NPCs provenientes de camundongos jovens com IL-17a por 4 e 7 dias aumentou o crescimento de neuritos positivos para MAP2 e, deste modo, a maturação de neurônios em diferenciação. Aumento da ramificação de neuritos de neurônios *in vitro* após tratamento com IL-17a também foi observado por outros estudos usando neurônios pós-ganglionares simpáticos de camundongos adultos⁽⁹⁷⁾ e neurônios sensoriais do gânglio da raiz dorsal de ratos adultos.⁽⁹⁸⁾ Por outro lado, Liu et al.⁽⁸⁸⁾ haviam descrito que camundongos nocautes para IL-17a apresentam maior neurogênese e transmissão sináptica no hipocampo adulto, o que sugere que essa citocina tenha um efeito negativo sobre a diferenciação e maturação neuronal nos nichos neurogênicos do cérebro murino adulto. Assim, os achados em relação aos efeitos da IL-17a sobre a diferenciação e maturação neuronal são controversos e existe a necessidade de maior investigação.

Estamos planejando conduzir novos experimentos de diferenciação para neurônios das amostras de NPCs humanas na presença da IL-17a aumentando o tempo de diferenciação neuronal e realizando análises adicionais como medida do tamanho e ramificação dos neuritos, número de sinapses, e funcionalidade dos neurônios. Ainda, se nossos resultados forem comprovados, pretendemos analisar as vias de sinalização intracelular envolvidas no processo de neurodiferenciação induzido pela IL-17a.

É interessante comentar também os resultados que tivemos com a análise da expressão constitutiva do receptor de IL-17a nos neurônios humanos jovens (14 dias de diferenciação), que expressam quantidades relativamente menores de IL17RA em comparação com as NPCs. Ainda não sabemos ao certo porque a expressão do receptor é regulada de forma negativa nos neurônios jovens, e qual a dinâmica de regulação da expressão de IL17RA à medida que os neurônios ficam mais maduros e pós-mitóticos. Como comentado acima, Yim et al.⁽⁴⁷⁾ mostraram que a expressão aumentada de IL17RA no encéfalo da prole de MIA (E14,5) vinha sobretudo de neurônios pós-mitóticos. Estamos, no momento, analisando a expressão de IL17RA nos neurônios intermediários (21 dias de diferenciação).

Com exceção da atividade de vias de sinalização intracelular específicas ativadas por IL-17a nas NPCs, não observamos, até o momento, outros fenótipos celulares que se diferenciam entre as amostras de NPCs derivadas de indivíduos com TEA (seja idiopático ou com mutação patogênica conhecida) e controles em resposta ao tratamento com IL-17a isoladamente. Sabemos que a IL-17a pode não agir individualmente, mas necessitar de outras moléculas (como outras citocinas pró-inflamatórias) para exercer seus efeitos sobre o neurodesenvolvimento. Ainda, sabemos que modelos *in vitro* que simulem um contexto cerebral mais fisiológico, com a presença de culturas mistas de células humanas neuronais e da glia poderiam ser mais apropriados para elucidar os mecanismos celulares e moleculares envolvidos na neuropatologia do TEA induzida pela IL-17a. Neste sentido, cabe comentar que nosso grupo de pesquisa iniciou a utilização do modelo de organoides cerebrais provenientes de iPSCs⁽⁹⁹⁾ para melhor explorar os efeitos da IL-17a sobre o neurodesenvolvimento e o TEA.

5 CONCLUSÕES

1. As amostras de células neuroprogenitoras derivadas de indivíduos com transtorno do espectro autista e controles não expressam constitutivamente a IL-17a, mas expressam constitutivamente o receptor de IL-17a (IL17RA/C), sugerindo que podem ser alvos em potencial da ação dessa citocina;

2. O tratamento das amostras de células neuroprogenitoras derivadas de indivíduos com transtorno do espectro autista e controles com IL-17a não alterou a expressão do receptor IL-17RA, reforçando os achados que o aumento da expressão de IL17RA no encéfalo após indução da ativação imune materna não é proveniente de células neuroprogenitoras;

3. As amostras de células neuroprogenitoras derivadas de indivíduos com transtorno do espectro autista e controles expressam constitutivamente diversas proteínas-chave constituintes de vias de sinalização intracelular clássicas ativadas pela IL-17a (ERK5, NF κ B-p65, SAP/JNK, ERK1/2, p38 e I κ B α), assim como de componentes da via mTORC1 (RPS6). As amostras de células neuroprogenitoras derivadas de indivíduos com transtorno do espectro autista apresentam expressão significativamente menor das proteínas quinases ERK1/2 da família das MAPKs e expressão significativamente maior da proteína I κ B α , que se associa aos fatores de transcrição NF- κ B, em comparação com as amostras de células neuroprogenitoras derivadas de indivíduos controles. O tratamento das amostras de células neuroprogenitoras com IL-17a modulou de forma diferente a atividade das proteínas quinases pERK1/2 da família das MAPKs e da proteína pRPS6 da via de sinalização mTORC1 nas amostras de células neuroprogenitoras derivadas de indivíduos com transtorno do espectro autista em comparação com as amostras de células neuroprogenitoras derivadas de indivíduos controles;

4. O tratamento das amostras de células neuroprogenitoras derivadas de indivíduos com transtorno do espectro autista e controles com IL-17a não alterou os fenótipos de proliferação e migração das células;

5. Neurônios jovens (14 dias de diferenciação) derivados da diferenciação das amostras de células neuroprogenitoras derivadas de indivíduos com transtorno do espectro autista e controles apresentam expressão relativamente menor de IL17RA comparados com células neuroprogenitoras;

6. O tratamento das amostras de células neuroprogenitoras derivadas de indivíduos com transtorno do espectro autista e controles com IL-17a durante o processo de diferenciação neuronal por 14 e 21 dias estimulou a expressão da proteína MAP2, constituinte dos microtúbulos e associada com maturação neuronal, e da proteína SINAPSINA1, envolvida na liberação de neurotransmissores.

6 REFERÊNCIAS

1. Kanner L. Autistic disturbances of affective contact. *Acta Paedopsychiatr.* 1968;35(4):100–36.
2. Baskin JH, Sperber M, Price BH. Asperger syndrome revisited. *Rev Neurol Dis.* 2006;3(1):1–7.
3. Blashfield RK, Keeley JW, Flanagan EH, Miles SR. The cycle of classification: DSM-I through DSM-5. *Annu Rev Clin Psychol.* 2014;10:25–51.
4. American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders: DSM-5. Thailand: American Psychiatric Association; 2013.
5. Baio J, Wiggins L, Christensen DL, Maenner MJ, Daniels J, Warren Z, et al. Prevalence of autism spectrum disorder among children aged 8 years - autism and developmental disabilities monitoring network, 11 sites, United States, 2014. *MMWR Surveill Summ.* 2018;67(6):1–23.
6. Dufour-Rainfray D, Vourc'h P, Tourlet S, Guilloteau D, Chalon S, Andres CR. Fetal exposure to teratogens: evidence of genes involved in autism. *Neurosci Biobehav Rev.* 2011;35(5):1254–65.
7. Bourgeron T. From the genetic architecture to synaptic plasticity in autism spectrum disorder. *Nat Rev Neurosci.* 2015;16(9):551–63.
8. Folstein S, Rutter M. Infantile autism: a genetic study of 21 twin pairs. *J Child Psychol Psychiatry.* 1977;18(4):297–321.
9. van der Zwaag B, Franke L, Poot M, Hochstenbach R, Spierenburg HA, Vorstman JA, et al. Gene-network analysis identifies susceptibility genes related to glycobiology in autism. *PLoS One.* 2009;4(5):e5324.
10. Ronald A, Hoekstra RA. Autism spectrum disorders and autistic traits: a decade of new twin studies. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2011;156B(3):255–74.
11. Gaugler T, Klei L, Sanders SJ, Bodea CA, Goldberg AP, Lee AB, et al. Most genetic risk for autism resides with common variation. *Nat Genet.* 2014;46(8):881–5.
12. Griesi-Oliveira K, Sertié AL. Autism spectrum disorders: an updated guide for genetic counseling. *Einstein (Sao Paulo).* 2017;15(2):233–8.
13. Marshall CR, Noor A, Vincent JB, Lionel AC, Feuk L, Skaug J, et al. Structural variation of chromosomes in autism spectrum disorder. *Am J Hum Genet.* 2008;82(2):477–88.
14. Glessner JT, Wang K, Cai G, Korvatska O, Kim CE, Wood S, et al. Autism genome-wide copy number variation reveals ubiquitin and neuronal genes. *Nature.* 2009;459(7246):569–73.

15. Depienne C, Moreno-De-Luca D, Heron D, Bouteiller D, Gennetier A, Delorme R, et al. Screening for genomic rearrangements and methylation abnormalities of the 15q11-q13 region in autism spectrum disorders. *Biol Psychiatry*. 2009;66(4):349–59.
16. Moreno-De-Luca D, Mulle JG, Kaminsky EB, Sanders SJ, Myers SM, Adam MP, et al.; SGENE Consortium; Simons Simplex Collection Genetics Consortium; GeneSTAR. Deletion 17q12 is a recurrent copy number variant that confers high risk of autism and schizophrenia. *Am J Hum Genet*. 2010;87(5):618–30.
17. Crepel A, Steyaert J, De la Marche W, De Wolf V, Fryns JP, Noens I, et al. Narrowing the critical deletion region for autism spectrum disorders on 16p11.2. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2011;156(2):243–5.
18. Casanova MF. Genetic counseling in autism. In: *Cortical chauvinism* [Internet]. [place unknown]; 2017 [cited 2020 Dec 1]. Available from: <https://corticalchauvinism.com/2017/03/06/genetic-counseling-in-autism/>
19. Pinto D, Delaby E, Merico D, Barbosa M, Merikangas A, Klei L, et al. Convergence of genes and cellular pathways dysregulated in autism spectrum disorders. *Am J Hum Genet*. 2014;94(5):677–94.
20. De Rubeis S, He X, Goldberg AP, Poultney CS, Samocha K, Cicek AE, et al.; DDD Study; Homozygosity Mapping Collaborative for Autism; UK10K Consortium. Synaptic, transcriptional and chromatin genes disrupted in autism. *Nature*. 2014;515(7526):209–15.
21. Yuen RK, Thiruvahindrapuram B, Merico D, Walker S, Tammimies K, Hoang N, et al. Whole-genome sequencing of quartet families with autism spectrum disorder. *Nat Med*. 2015;21(2):185–91.
22. Brimberg L, Sadiq A, Gregersen PK, Diamond B. Brain-reactive IgG correlates with autoimmunity in mothers of a child with an autism spectrum disorder. *Mol Psychiatry*. 2013;18(11):1171–7.
23. Estes ML, McAllister AK. Maternal immune activation: implications for neuropsychiatric disorders. *Science*. 2016;353(6301):772–7.
24. Sulek CM, Farooqi N, Verly M, Lim TK, Ruthazer ES. Maternal immune activation in neurodevelopmental disorders. *Dev Dyn*. 2018;247(4):588–619.
25. Meyer U, Yee BK, Feldon J. The neurodevelopmental impact of prenatal infections at different times of pregnancy: the earlier the worse? *Neuroscientist*. 2007;13(3):241–56.
26. Swisher CN, Swisher L. Letter: congenital rubella and autistic behavior. *N Engl J Med*. 1975;293(4):198.
27. Atladóttir HO, Thorsen P, Ostergaard L, Schendel DE, Lemcke S, Abdallah M, et al. Maternal infection requiring hospitalization during pregnancy and autism spectrum disorders. *J Autism Dev Disord*. 2010;40(12):1423–30.
28. Zerbo O, Iosif AM, Walker C, Ozonoff S, Hansen RL, Hertz-Picciotto I. Is maternal influenza or fever during pregnancy associated with autism or developmental delays? Results from the CHARGE (Childhood Autism Risks from Genetics and Environment) study. *J Autism Dev Disord*. 2013;43(1):25–33.

29. Lee BK, Magnusson C, Gardner RM, Blomström A, Newschaffer CJ, Burstyn I, et al. Maternal hospitalization with infection during pregnancy and risk of autism spectrum disorders. *Brain Behav Immun*. 2015;44:100–5.
30. Abdallah MW, Larsen N, Mortensen EL, Atladóttir HO, Nørgaard-Pedersen B, Bonefeld-Jørgensen EC, et al. Neonatal levels of cytokines and risk of autism spectrum disorders: an exploratory register-based historic birth cohort study utilizing the Danish Newborn Screening Biobank. *J Neuroimmunol*. 2012;252(1-2):75–82.
31. Abdallah MW, Larsen N, Grove J, Bonefeld-Jørgensen EC, Nørgaard-Pedersen B, Hougaard DM, et al. Neonatal chemokine levels and risk of autism spectrum disorders: findings from a Danish historic birth cohort follow-up study. *Cytokine*. 2013;61(2):370–6.
32. Ehninger D, Sano Y, de Vries PJ, Dies K, Franz D, Geschwind DH, et al. Gestational immune activation and Tsc2 haploinsufficiency cooperate to disrupt fetal survival and may perturb social behavior in adult mice. *Mol Psychiatry*. 2012;17(1):62–70.
33. Le Belle JE, Sperry J, Ngo A, Ghochani Y, Laks DR, López-Aranda M, et al. Maternal inflammation contributes to brain overgrowth and autism-associated behaviors through altered redox signaling in stem and progenitor cells. *Stem Cell Reports*. 2014;3(5):725–34.
34. Mazina V, Gerdtz J, Trinh S, Ankenman K, Ward T, Dennis MY, et al. Epigenetics of autism-related impairment: copy number variation and maternal infection. *J Dev Behav Pediatr*. 2015;36(2):61–7.
35. Oskvig DB, Elkahoun AG, Johnson KR, Phillips TM, Herkenham M. Maternal immune activation by LPS selectively alters specific gene expression profiles of interneuron migration and oxidative stress in the fetus without triggering a fetal immune response. *Brain Behav Immun*. 2012;26(4):623–34.
36. Lombardo MV, Moon HM, Su J, Palmer TD, Courchesne E, Pramparo T. Maternal immune activation dysregulation of the fetal brain transcriptome and relevance to the pathophysiology of autism spectrum disorder. *Mol Psychiatry*. 2018;23(4):1001–13.
37. Magdalon J, Sánchez-Sánchez SM, Griesi-Oliveira K, Sertié AL. Dysfunctional mTORC1 signaling: a convergent mechanism between syndromic and nonsyndromic forms of autism spectrum disorder? *Int J Mol Sci*. 2017;18(3):659.
38. Patterson PH. Maternal infection: window on neuroimmune interactions in fetal brain development and mental illness. *Curr Opin Neurobiol*. 2002;12(1):115–8.
39. Malkova NV, Yu CZ, Hsiao EY, Moore MJ, Patterson PH. Maternal immune activation yields offspring displaying mouse versions of the three core symptoms of autism. *Brain Behav Immun*. 2012;26(4):607–16.
40. Hsiao EY, McBride SW, Chow J, Mazmanian SK, Patterson PH. Modeling an autism risk factor in mice leads to permanent immune dysregulation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012;109(31):12776–81.
41. Kim S, Kim H, Yim YS, Ha S, Atarashi K, Tan TG, et al. Maternal gut bacteria promote neurodevelopmental abnormalities in mouse offspring. *Nature*. 2017;549(7673):528–32.

42. Bauman MD, Iosif AM, Smith SE, Bregere C, Amaral DG, Patterson PH. Activation of the maternal immune system during pregnancy alters behavioral development of rhesus monkey offspring. *Biol Psychiatry*. 2014;75(4):332–41.
43. Machado CJ, Whitaker AM, Smith SE, Patterson PH, Bauman MD. Maternal immune activation in nonhuman primates alters social attention in juvenile offspring. *Biol Psychiatry*. 2015;77(9):823–32.
44. Samuelsson AM, Jennische E, Hansson HA, Holmång A. Prenatal exposure to interleukin-6 results in inflammatory neurodegeneration in hippocampus with NMDA/GABA(A) dysregulation and impaired spatial learning. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2006;290(5):R1345–56.
45. Smith SE, Li J, Garbett K, Mirnics K, Patterson PH. Maternal immune activation alters fetal brain development through interleukin-6. *J Neurosci*. 2007;27(40):10695–702.
46. Choi GB, Yim YS, Wong H, Kim S, Kim H, Kim SV, et al. The maternal interleukin-17a pathway in mice promotes autism-like phenotypes in offspring. *Science*. 2016;351(6276):933–9.
47. Shin Yim Y, Park A, Berrios J, Lafourcade M, Pascual LM, Soares N, et al. Reversing behavioural abnormalities in mice exposed to maternal inflammation. *Nature*. 2017;549(7673):482–7.
48. Reed MD, Yim YS, Wimmer RD, Kim H, Ryu C, Welch GM, et al. IL-17a promotes sociability in mouse models of neurodevelopmental disorders. *Nature*. 2020;577(7789):249–53.
49. Li Z, Li K, Zhu L, Kan Q, Yan Y, Kumar P, et al. Inhibitory effect of IL-17 on neural stem cell proliferation and neural cell differentiation. *BMC Immunol*. 2013;14(1):20.
50. Tfilin M, Turgeman G. Interleukine-17 administration modulates adult hippocampal neurogenesis and improves spatial learning in mice. *J Mol Neurosci*. 2019;69(2):254–63.
51. Suzuki K, Matsuzaki H, Iwata K, Kameno Y, Shimmura C, Kawai S, et al. Plasma cytokine profiles in subjects with high-functioning autism spectrum disorders. *PLoS One*. 2011;6(5):e20470.
52. Al-Ayadhi LY, Mostafa GA. Elevated serum levels of interleukin-17A in children with autism. *J Neuroinflammation*. 2012;9(1):158.
53. Nadeem A, Ahmad SF, Attia SM, Bakheet SA, Al-Harbi NO, Al-Ayadhi LY. Activation of IL-17 receptor leads to increased oxidative inflammation in peripheral monocytes of autistic children. *Brain Behav Immun*. 2018;67:335–44.
54. Iwakura Y, Nakae S, Saijo S, Ishigame H. The roles of IL-17A in inflammatory immune responses and host defense against pathogens. *Immunol Rev*. 2008;226(1):57–79.
55. Puel A, Cypowyj S, Bustamante J, Wright JF, Liu L, Lim HK, et al. Chronic mucocutaneous candidiasis in humans with inborn errors of interleukin-17 immunity. *Science*. 2011;332(6025):65–8.
56. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 cells. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:485–517.

57. Hymowitz SG, Filvaroff EH, Yin JP, Lee J, Cai L, Risser P, et al. IL-17s adopt a cystine knot fold: structure and activity of a novel cytokine, IL-17F, and implications for receptor binding. *EMBO J.* 2001;20(19):5332–41.
58. Li X, Bechara R, Zhao J, McGeachy MJ, Gaffen SL. IL-17 receptor-based signaling and implications for disease. *Nat Immunol.* 2019;20(12):1594–602.
59. Amatya N, Garg AV, Gaffen SL. IL-17 Signaling: The Yin and the Yang. *Trends Immunol.* 2017;38(5):310–22.
60. Gu C, Wu L, Li X. IL-17 family: cytokines, receptors and signaling. *Cytokine.* 2013;64(2):477–85.
61. Song X, Qian Y. The activation and regulation of IL-17 receptor mediated signaling. *Cytokine.* 2013;62(2):175–82.
62. Qian Y, Liu C, Hartupree J, Altuntas CZ, Gulen MF, Jane-Wit D, et al. The adaptor Act1 is required for interleukin 17-dependent signaling associated with autoimmune and inflammatory disease. *Nat Immunol.* 2007;8(3):247–56.
63. Napetschnig J, Wu H. Molecular basis of NF- κ B signaling. *Annu Rev Biophys.* 2013;42:443–68.
64. Patel DN, King CA, Bailey SR, Holt JW, Venkatachalam K, Agrawal A, et al. Interleukin-17 stimulates C-reactive protein expression in hepatocytes and smooth muscle cells via p38 MAPK and ERK1/2-dependent NF- κ B and C/EBP β activation. *J Biol Chem.* 2007;282(37):27229–38.
65. Huang H, Kim HJ, Chang EJ, Lee ZH, Hwang SJ, Kim HM, et al. IL-17 stimulates the proliferation and differentiation of human mesenchymal stem cells: implications for bone remodeling. *Cell Death Differ.* 2009;16(10):1332–43.
66. Wu L, Chen X, Zhao J, Martin B, Zepp JA, Ko JS, et al. A novel IL-17 signaling pathway controlling keratinocyte proliferation and tumorigenesis via the TRAF4-ERK5 axis. *J Exp Med.* 2015;212(10):1571–87.
67. Saxena A, Raychaudhuri SK, Raychaudhuri SP. Interleukin-17-induced proliferation of fibroblast-like synovial cells is mTOR dependent. *Arthritis Rheum.* 2011;63(5):1465–6.
68. Gaffen SL. Structure and signalling in the IL-17 receptor family. *Nat Rev Immunol.* 2009;9(8):556–67.
69. Gaffen SL, Jain R, Garg AV, Cua DJ. The IL-23-IL-17 immune axis: from mechanisms to therapeutic testing. *Nat Rev Immunol.* 2014;14(9):585–600.
70. Iwakura Y, Ishigame H, Saijo S, Nakae S. Functional specialization of interleukin-17 family members. *Immunity.* 2011;34(2):149–62.
71. Chang SH, Dong C. Signaling of interleukin-17 family cytokines in immunity and inflammation. *Cell Signal.* 2011;23(7):1069–75.

72. Das Sarma J, Ciric B, Marek R, Sadhukhan S, Caruso ML, Shafagh J, et al. Functional interleukin-17 receptor A is expressed in central nervous system glia and upregulated in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroinflammation*. 2009;6(1):14.
73. Kawanokuchi J, Shimizu K, Nitta A, Yamada K, Mizuno T, Takeuchi H, et al. Production and functions of IL-17 in microglia. *J Neuroimmunol*. 2008;194(1-2):54–61.
74. Paintlia MK, Paintlia AS, Singh AK, Singh I. Synergistic activity of interleukin-17 and tumor necrosis factor- α enhances oxidative stress-mediated oligodendrocyte apoptosis. *J Neurochem*. 2011;116(4):508–21.
75. Hu MH, Zheng QF, Jia XZ, Li Y, Dong YC, Wang CY, et al. Neuroprotection effect of interleukin (IL)-17 secreted by reactive astrocytes is emerged from a high-level IL-17-containing environment during acute neuroinflammation. *Clin Exp Immunol*. 2014;175(2):268–84.
76. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006;126(4):663–76.
77. Sánchez-Sánchez SM, Magdalon J, Griesi-Oliveira K, Yamamoto GL, Santacruz-Perez C, Fogo M, et al. Rare RELN variants affect Reelin-DAB1 signal transduction in autism spectrum disorder. *Hum Mutat*. 2018;39(10):1372–83.
78. Griesi-Oliveira K, Fogo MS, Pinto BG, Alves AY, Suzuki AM, Morales AG, et al. Transcriptome of iPSC-derived neuronal cells reveals a module of co-expressed genes consistently associated with autism spectrum disorder. *Mol Psychiatry*. 2021;26(5):1589–605.
79. Mariani J, Coppola G, Zhang P, Abyzov A, Provini L, Tomasini L, et al. FOXP1-dependent dysregulation of GABA/Glutamate neuron differentiation in autism spectrum disorders. *Cell*. 2015;162(2):375–90.
80. Marchetto MC, Belinson H, Tian Y, Freitas BC, Fu C, Vadodaria K, et al. Altered proliferation and networks in neural cells derived from idiopathic autistic individuals. *Mol Psychiatry*. 2017;22(6):820–835.
81. Russo FB, Freitas BC, Pignatari GC, Fernandes IR, Sebat J, Muotri AR, et al. Modeling the interplay between neurons and astrocytes in autism using human induced pluripotent stem cells. *Biol Psychiatry*. 2018;83(7):569–78.
82. Schafer ST, Paquola AC, Stern S, Gosselin D, Ku M, Pena M, et al. Pathological priming causes developmental gene network heterochronicity in autistic subject-derived neurons. *Nat Neurosci*. 2019;22(2):243–55.
83. Splawski I, Yoo DS, Stotz SC, Cherry A, Clapham DE, Keating MT. CACNA1H mutations in autism spectrum disorders. *J Biol Chem*. 2006;281(31):22085–91.
84. Miller DT, Shen Y, Weiss LA, Korn J, Anselm I, Bridgemohan C, et al. Microdeletion/duplication at 15q13.2q13.3 among individuals with features of autism and other neuropsychiatric disorders. *J Med Genet*. 2009;46(4):242–8.
85. da Silva Montenegro EM, Costa CS, Campos G, Scliar M, de Almeida TF, Zachy EC, et al. Meta-analyses support previous and novel autism candidate genes: outcomes of an unexplored Brazilian cohort. *Autism Res*. 2020;13(2):199–206.

86. Griesi-Oliveira K, Acab A, Gupta AR, Sunaga DY, Chailangkarn T, Nicol X, et al. Modeling non-syndromic autism and the impact of TRPC6 disruption in human neurons. *Mol Psychiatry*. 2015;20(11):1350–65.
87. Imura T, Kornblum HI, Sofroniew MV. The predominant neural stem cell isolated from postnatal and adult forebrain but not early embryonic forebrain expresses GFAP. *J Neurosci*. 2003;23(7):2824–32.
88. Liu Q, Xin W, He P, Turner D, Yin J, Gan Y, et al. Interleukin-17 inhibits adult hippocampal neurogenesis. *Sci Rep*. 2014;4(1):7554.
89. Rodgers JM, Robinson AP, Rosler ES, Lariosa-Willingham K, Persons RE, Dugas JC, et al. IL-17A activates ERK1/2 and enhances differentiation of oligodendrocyte progenitor cells. *Glia*. 2015;63(5):768–79.
90. Liu T, Han S, Dai Q, Zheng J, Liu C, Li S, et al. IL-17A-mediated excessive autophagy aggravated neuronal ischemic injuries via Src-PP2B-mTOR pathway. *Front Immunol*. 2019;10:2952.
91. Samuels IS, Saitta SC, Landreth GE. MAP'ing CNS development and cognition: an ERKsome process. *Neuron*. 2009;61(2):160–7.
92. Cesarini L, Alfieri P, Pantaleoni F, Vasta I, Cerutti M, Petrangeli V, et al. Cognitive profile of disorders associated with dysregulation of the RAS/MAPK signaling cascade. *Am J Med Genet A*. 2009;149A(2):140–6.
93. Takei N, Nawa H. mTOR signaling and its roles in normal and abnormal brain development. *Front Mol Neurosci*. 2014;7:28.
94. LiCausi F, Hartman NW. Role of mTOR complexes in neurogenesis. *Int J Mol Sci*. 2018;19(5):1544.
95. Shen F, Gaffen SL. Structure-function relationships in the IL-17 receptor: implications for signal transduction and therapy. *Cytokine*. 2008;41(2):92–104.
96. Sasaki T, Tome S, Takei Y. Intraventricular IL-17A administration activates microglia and alters their localization in the mouse embryo cerebral cortex. *Mol Brain*. 2020;13(1):93.
97. Chisholm SP, Cervi AL, Nagpal S, Lomax AE. Interleukin-17A increases neurite outgrowth from adult postganglionic sympathetic neurons. *J Neurosci*. 2012;32(4):1146–55.
98. Habash T, Saleh A, Roy Chowdhury SK, Smith DR, Fernyhough P. The proinflammatory cytokine, interleukin-17A, augments mitochondrial function and neurite outgrowth of cultured adult sensory neurons derived from normal and diabetic rats. *Exp Neurol*. 2015;273:177–89.
99. Sloan SA, Andersen J, Paşca AM, Birey F, Paşca SP. Generation and assembly of human brain region-specific three-dimensional cultures. *Nat Protoc*. 2018;13(9):2062–85.

Abstract

Introduction: Prenatal exposure to maternal immune activation has been implicated as an environmental risk factor for Autism Spectrum Disorder (autism). Animal models have suggested that infection and immune activation during pregnancy elevates maternal pro-inflammatory cytokines that interfere with normal fetal brain development. Among them, Interleukin 17a has been shown to play a key role in the development of abnormal brain cytoarchitecture and autism-like behaviors in the maternal immune activation offspring. However, the cellular and molecular mechanisms by which IL-17a acts to induce these phenotypes are still poorly understood, especially in humans. **Purpose:** To verify whether IL-17a affects the proliferation, migration, and differentiation rates of human neural cells; To verify which intracellular signaling pathways are activated by IL-17a and are related to these cellular phenotypes; To verify whether increase in IL-17a associated with a genetic background of autism susceptibility could act in synergy to amplify any phenotypic abnormalities in human neural cells. **Methods:** Induced pluripotent stem cell-derived neural progenitor cells of autism individuals (n=7) and neurotypical control individuals (n=5) were treated with IL-17a or vehicle, and the expression levels of IL-17a receptor (IL17RA/C), and of IL-17a intracellular signaling pathways were measured; in addition, measurements of NPC proliferation, migration, and neural differentiation rates were taken. **Results:** Neural progenitor cells constitutively express IL17RA/C, but do not IL-17a, under basal conditions; IL-17a modulates the activity of the ERK1/2 and mTORC1 signaling pathways differently in autism-derived neural progenitor cells compared to control-derived neural progenitor cells; IL-17a does not alter the proliferation and migration rates of neural progenitor cells; IL-17a stimulates expression of neuronal markers (such as MAP2 and SYN1) during neuron differentiation from neural progenitor cells. **Conclusions:** Our results suggest that human neural progenitor cells are potential targets of IL-17a because they endogenously express IL-17RA/C, and this cytokine activates intracellular signaling pathways in these cells; ERK1/2 and mTORC1 signaling pathways may be involved in IL-17a-mediated abnormal phenotypes in autism-derived neural progenitor cells; IL-17a stimulates neurogenesis and/or neuronal maturation of human neural progenitor cells.

Keywords: Autism spectrum disorder; Infections; Interleukin 17; Induced pluripotent stem cells; Neurodevelopmental disorders

Apêndices

Apêndice 1. Expressão proteica relativa de p-NFKB-p65 e NFKB-65 total em astrócitos e células neuroprogenitoras controle após o tratamento com IL-17a

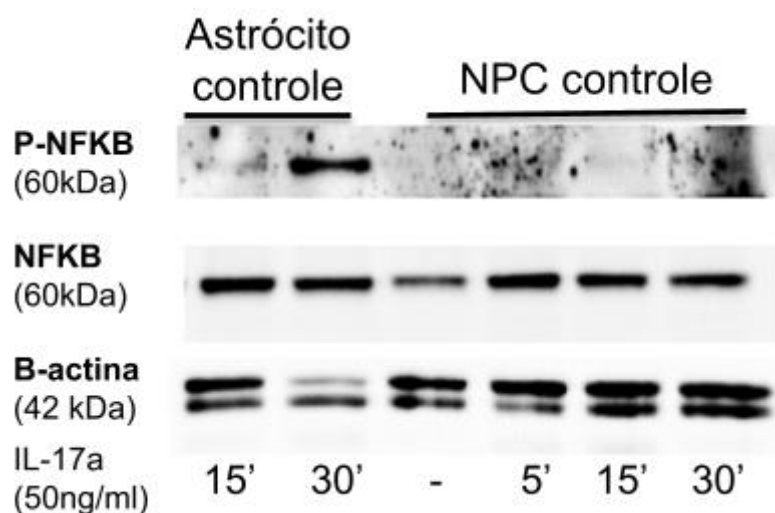
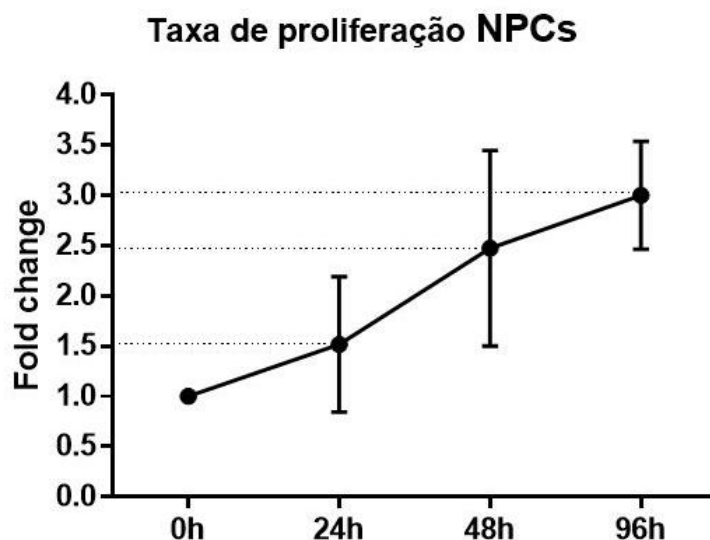


Imagem representativa de Western Blot para detecção de p-NFKB-p65, NFKB-65, e β -actina nas amostras de: astrócitos derivados de iPSCs de 1 indivíduo controle (que foram utilizadas como controle positivo de expressão de p-NFKB-p65), as quais foram tratadas com IL-17a (50ng/mL) por 15 e 30 minutos; NPCs derivadas de iPSCs de 1 indivíduo controle, as quais foram tratadas com veículo (-) ou IL-17a (50ng/mL) por 5, 15 e 30 minutos (10ug proteína, gel 10% poliácridamida). Observamos que nas NPCs humanas a IL-17a isoladamente não ativa a fosforilação de p-NFKB-p65.

Apêndice 2. Taxa de proliferação basal das amostras de células neuroprogenitoras



Fold change do número de células obtidos após 24h, 48h e 96h do plaqueamento em relação ao dia zero (0h). Amostras de NPCs derivadas de indivíduos controles (n=6) e de indivíduos com TEA (n=7) crescem numa taxa média de 1,5x em 24h, 2,5x em 48h e 3x em 96h. Método de contagem automatizada por exclusão de azul de tripan 0,4%. Plaqueamento inicial: 150.000 células. Para a realização dos experimentos, foram utilizadas: amostras de NPCs derivadas de 5 indivíduos controles, sendo que para 4 indivíduos foram utilizadas amostras geradas de 1 clone de iPSCs, e para 1 indivíduo foram utilizadas amostras geradas de 2 clones de iPSCs, totalizando 6 amostras de NPCs controles; amostras de NPCs geradas de 1 clone de iPSCs de 7 indivíduos com TEA, sendo 4 indivíduos com TEA idiopático e 3 indivíduos com TEA com mutação associada.