



UFBA

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**



FIOCRUZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**GERAÇÃO DE LINHAGENS DE CÉLULAS-TRONCO PLURIPOTENTES
INDUZIDAS COM ALTERAÇÃO NO GENE SCN2A E ORGANOIDES CEREBRAIS
COMO FERRAMENTAS PARA ESTUDO DO AUTISMO**

GABRIELA LOUISE DE ALMEIDA SAMPAIO

**Salvador – Bahia
2019**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

Curso de Pós-Graduação em Patologia

**GERAÇÃO DE LINHAGENS DE CÉLULAS-TRONCO PLURIPOTENTES
INDUZIDAS COM ALTERAÇÃO NO GENE SCN2A E ORGANOIDES CEREBRAIS
COMO FERRAMENTAS PARA ESTUDO DO AUTISMO**

GABRIELA LOUISE DE ALMEIDA SAMPAIO

Orientador: Dr. Bruno Solano de Freitas Souza
Co-orientadora: Dra. Milena Botelho Pereira Soares

Dissertação apresentada ao Curso
de Pós-Graduação em Patologia
Humana para a obtenção do grau de
Mestre.

**Salvador – Bahia
2019**

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Instituto Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

S192g Sampaio, Gabriela Louise de Almeida.
Geração de linhagens de células tronco pluripotente induzidas com alteração
no gene SCN2A e organoides cerebrais como ferramenta para estudo do autismo.
/ Gabriela Louise de Almeida Sampaio. - 2019.
78 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Bruno Solano de Freitas Souza, Laboratório de
Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia.

Dissertação (Mestrado em Patologia) –Faculdade de Medicina, Universidade
Federal da Bahia. Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, 2019.

1. Autismo. 2. Organoides. 3. Células tronco. 4. CRISPR. I. Título.

CDU 616.89:57.086.83

"GERAÇÃO DE LINHAGENS DE CÉLULAS-TRONCO PLURIPOTENTES INDUZIDAS COM ALTERAÇÃO NO GENE SCN2A E ORGANOIDES CEREBRAIS COMO FERRAMENTAS PARA ESTUDO DO AUTISMO".

Gabriela Louise de Almeida Sampaio

FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 20 de maio de 2019.

COMISSÃO EXAMINADORA



Dr. Vitor Antonio Fortuna
Professor Associado
UFBA



Dr. Leonardo Paiva Farias
Pesquisador
IGM/FIOCRUZ



Dr. Bruno Solano de Freitas Souza
Pesquisador
IGM/FIOCRUZ

FONTES DE FINANCIAMENTO

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus pais José Alberto e Elenilda, eles foram os verdadeiros incentivadores da ciência na minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por estar sempre a minha frente, iluminando meu caminho, e me cercando de coisas boas.

Aos meus pais e ao meu irmão por serem meu porto seguro, minha fortaleza, meus maiores estresses e minhas melhores alegrias.

Aos colegas de bancada que se tornaram amigos e sem os quais nada disso teria sido possível: Carine, Roquelina, Rose, Brunos, Luciana, Carolina Nonaka, Gabrielle, Jéssica, Emanuelle, Diogo, Daniela, Kyan, Otávio, Katia, Thais, Girlane, Karoline, Gabriela e de forma muito especial ao meu códon que não me permitiu fraquejar em nenhum momento: Iasmim Orge e Patrícia Damasceno.

Ao meu orientador Bruno Solano, que tem me orientado desde o primeiro dia em que pisei num laboratório, e acompanhado toda minha trajetória e mesmo nos momentos mais difíceis nunca perdendo o entusiasmo.

Também não posso deixar de agradecer a Dr Ricardo Ribeiro e Dra Milena Soares, por terem me aberto as portas do CBTC e me apresentado ao mundo das pesquisas com células tronco, foi uma grande honra trabalhar com pesquisadores tão renomados.

À professora Andrea Gusmão, grande incentivadora e sempre disponível para o que for necessário, que alegria poder contar sempre com seu apoio.

No mais agradeço a todos da minha família, às amigas de escola, aos amigos do intercâmbio, às pessoas que conheci ao longo dessa trajetória e fizeram a diferença na minha vida.

Muito Obrigada!

P.S. Gostaria de agradecer também a todas as pessoas que de algum modo criaram alguma dificuldade para realização desse trabalho, a gente não aprende a superar barreiras sem ter barreiras para enfrentar, e o que seria da vida sem um pouco de emoção? Saudações.

Agradecimentos à biblioteca.

“Mary* fingiu não perceber. *Outra vez*, ela pensou, e continuou comendo seu sanduíche. *A amostra pode esperar até eu terminar*. Mary estava cansada da cultura de células [...], cansada de ver células morrerem após horas de trabalho. *Me preocupar por quê?*”

Rebecca Skloot, A Vida Imortal de Henrietta Lacks (2011)

***Mary Kubicek foi responsável pelo primeiro cultivo de células humanas em laboratório. Esse trecho se refere ao dia do isolamento dessas células.**

SAMPAIO, Gabriela Louise de Almeida. Geração de linhagens de células tronco pluripotente induzidas com alteração no gene SCN2A e organoides cerebrais como ferramenta para estudo do autismo. 2019. 78 f. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia. Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2019.

RESUMO

INTRODUÇÃO: Transtornos do espectro autista (TEAs) compõem um grupo de doenças que afetam a interação social, comunicação e comportamento. Nos últimos anos, inúmeras alterações em diferentes genes vêm sendo associadas com TEA. Dentre estes, variantes patogênicas SCN2A vêm apresentando uma forte associação estatística com TEA. O SCN2A codifica a subunidade alfa do canal de sódio voltagem-dependente $Na_v1.2$, que é altamente expresso em células piramidais durante o desenvolvimento do cérebro. Estes neurônios desempenham um papel crítico na organização cortical, excitabilidade e sinaptogênese. Apesar da associação estatística, não há ainda estudos que comprovem a causalidade e os possíveis mecanismos envolvidos na fisiopatologia. Deste modo, a hipótese deste trabalho é de que mutações com perda de função no SCN2A afetam o desenvolvimento do cérebro desde suas etapas iniciais, podendo levar ao desenvolvimento de TEA, e que este processo pode ser estudado *in vitro* a partir da utilização de células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs) e organoides cerebrais. **OBJETIVO:** Estabelecer ferramentas que permitam a investigação do impacto da mutação do gene SCN2A sobre as fases iniciais do neurodesenvolvimento. **MÉTODOS:** Células-tronco mesenquimais obtidas de uma paciente portadora de TEA e variante patogênica em heterozigose do gene SCN2A foram reprogramadas utilizando vetores não integrativos para obtenção de uma linhagem de iPSCs (iM5). Esta linhagem foi caracterizada quanto à expressão de marcadores de pluripotência, utilizada em ensaio de formação de corpos embrionários e por análise de cariótipo. Outra linhagem de iPSC, previamente obtida a partir de doador saudável (EB4), foi submetida à edição gênica utilizando a tecnologia CRISPR/Cas9 para geração de uma linhagem *knockout* para SCN2A. As iPSCs foram induzidas à formação de organoides cerebrais *in vitro*, que foram avaliados periodicamente quanto à morfologia e expressão de marcadores relacionados ao desenvolvimento cortical. A expressão do SCN2A foi avaliada nos organoides por PCR e imunofluorescência. **RESULTADOS:** As linhagens de iPSCs obtidas apresentaram morfologia característica, expressão dos marcadores de pluripotência, cariótipo normal e se diferenciaram em células dos três folhetos embrionários *in vitro*. A edição do gene SCN2A realizada na linhagem EB4 deu origem à linhagem *knockout* EB4^{CRISPR}. O protocolo utilizado para formação de organoides cerebrais foi aplicado nas linhagens EB4, EB4^{CRISPR} e EA1, esta última referente à iPSCs de um outro doador saudável. A expressão de SCN2A foi observada nos neurônios presentes no organoide. Foi observada a presença de neurosetas na 1^a semana e, a partir da 3^a semana, a presença de células progenitoras Sox2⁺ mais concentradas nas regiões internas do organoide, com neurônios β III tubulina⁺ localizados na região mais externa. Já a linhagem EB4^{CRISPR} formou organoides maiores, com menor expressão de marcadores de diferenciação cortical e desorganização. **CONCLUSÃO:** Neste trabalho geramos duas linhagens de iPSCs com mutações no gene SCN2A e estabelecemos uma plataforma para geração de organoides que podem ser utilizados como ferramentas para estudo de doenças do neurodesenvolvimento, como TEAs. Alterações na formação das estruturas do organoide foram identificadas nas células *knockout* para SCN2A, sugerindo um papel importante deste gene nas etapas iniciais da formação do cérebro.

Palavras-Chave: Autismo; SCN2A; iPSC; Organoides cerebrais; CRISPR

SAMPAIO, Gabriela Louise de Almeida. Generation of induced pluripotent stem cell lines with alteration in the SCN2A gene and brain organoids as a tool for the study of autism. 2019. 78 f. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia. Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2019.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Autism spectrum disorders (ASDs) are a group of diseases that affect social interaction, communication and behavior. In recent years, a large number of changes in different genes have been associated with ASD. Among these, pathogenic variants SCN2A has been presenting a strong statistical association with ASD. SCN2A encodes the alpha subunit of the voltage-dependent sodium channel Nav1.2, which is highly expressed in pyramidal cells during brain development. These neurons play a critical role in cortical organization, excitability and synaptogenesis. Despite the statistical association, there are no studies that prove the causality and the possible mechanisms involved in its pathophysiology. Thus, the hypothesis of this work is that mutations with loss of function in SCN2A affect the initial stages of brain development, which may lead to the development of ASD and that this process can be studied *in vitro* by the use of stem cells induced pluripotent (iPSCs) and brain organoids. **OBJECTIVE:** Establish a platform to investigate the impact of the gene SCN2A mutation on early stages of neurodevelopment. **METHODS:** Mesenchymal stem cells obtained from a patient with ASD and pathogenic variant in heterozygosis of the SCN2A gene were reprogrammed using nonintegrative vectors to obtain a lineage of iPSCs (iM5). This strain was characterized for the expression of pluripotency markers, embryoid body formation assay and karyotype. Another lineage of iPSC, previously obtained from a healthy donor (EB4), was submitted to gene editing using CRISPR / Cas9 technology to generate a knockout lineage for SCN2A. iPSCs were stimulated to differentiate into brain organoids, which were periodically evaluated for morphology and expression of markers related to cortical development. The expression of SCN2A was evaluated in the organoids by PCR and immunofluorescence. **RESULTS:** The obtained iPSC lineages presented characteristic morphology, expression of pluripotency markers, normal karyotype and were able to differentiate into cells of the three embryonic leaflets *in vitro*. The edition of the SCN2A gene in the EB4 line generated the EB4^{CRISPR} knockout cell line. The protocol used for brain organ formation was applied to the EB4, EB4^{CRISPR} and EA1 lines, the latter referring to iPSCs from another healthy donor. The expression of SCN2A was observed in the neurons present in the organoid. The presence of neurospheres was observed in the 1st week and the 3rd week, the presence of Sox2⁺ progenitor cells were more concentrated in the internal regions of the organoid, with β III tubulin⁺ neurons located in the outermost region. The EB4^{CRISPR} line formed larger organoids, with lower expression of markers of cortical differentiation and disorganization. **CONCLUSION:** In this work we generated two lines of iPSCs with mutations in the SCN2A gene and established a platform for the generation of organoids that can be used as tools for the study of neurodevelopmental diseases, such as ASDs. Changes in the formation of organoid structures were identified in the knockout cells for SCN2A, suggesting an important role of this gene in the early stages of brain formation.

Key Word: Autism; SCN2A; iPSC; Brain organoids; CRISPR

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.	Migração neuronal durante o desenvolvimento cortical.....	14
Figura 2.	Prevalência estimada de autismo na população norte-americana.....	17
Figura 3.	Dinâmica do potencial de ação em neurônios.. ..	19
Figura 4.	Estrutura do canal de sódio voltagem-dependente $Na_v1.2$. ..	20
Figura 5.	Métodos para obtenção de iPSC, diferenciação celular, edição gênica e suas aplicações em pesquisa.. ..	23
Figura 6.	Métodos de edição gênica utilizando CRISPR/Cas9.....	25
Figura 7.	Estágios de maturação dos organoides cerebrais e sua correlação com o desenvolvimento do cérebro humano	27
Figura 8.	Diversidade celular presente em organoides cerebrais em diferentes estágios de maturação.....	28
Figura 9.	Aplicações de organoides cerebrais e tecnologia CRISPR/Cas9 para o estudo do autismo.....	29
Figura 10.	Exame de sequenciamento do exoma realizado em paciente portadora de TEA....	32
Figura 11.	Reprogramação das células mesenquimais de paciente com autismo.. ..	44
Figura 12.	Expressão de marcadores de pluripotência em quatro clones de células reprogramadas.....	45
Figura 13.	Caracterização do clone iM5 das células reprogramadas da paciente autista portadora da mutação no gene SCN2A.....	48
Figura 14.	Ensaio de formação de corpos embrioides a partir da iPSC iM5.....	49
Figura 15.	Clonagem do gRNA no plasmídeo PX459.	50
Figura 16.	Padronização do protocolo de nucleofecção e seleção de clones resistentes à puromicina	52
Figura 17.	Dados de sequenciamento das células modificadas e controles.....	53
Figura 18.	Predição da sequência da proteína a partir dos dados de sequenciamento do SCN2A nas diferentes linhagens de iPSC.	54
Figura 19.	Expressão dos marcadores de pluripotência na linhagem EB4 ^{CRISPR}	56
Figura 20.	Ensaio de formação de corpos embrioides em células EB4 ^{CRISPR}	57
Figura 21.	Geração de organoides cerebrais a partir de iPSC	60
Figura 22.	Caracterização por imunofluorescência dos organoides cerebrais gerados a partir das células EA1.....	62
Figura 23.	Caracterização por imunofluorescência dos organoides cerebrais gerados a partir das células EB4 e EB4 ^{CRISPR}	64
Figura 24.	Análise das estruturas dos organoides gerados a partir de EB4 e EB4 ^{CRISPR}	65
Figura 25.	Expressão do SCN2A em organoides cerebrais.....	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Tabela de Anticorpos	36
Tabela 2. Tabela de Primers	40
Tabela 3. Confirmação da identidade das iPSCs a partir de análise de STR.....	46
Tabela 4. Confirmação da identidade da linhagem EB4 ^{CRISPR} por análise de STR.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFP	Alfa feto proteína
BSA	Albumina serica bovina (<i>BovineSerumAlbumin</i>)
CDC	Centro de Controle e Prevenção de Doenças
cDNA	DNA complementar
CRISPR	Clusters de Repetições Palindrômicas Curtas Regularmente Intercaladasdo(<i>ClusteredRegularlyInterspaced PalindromicRepeat</i>) <i>Short</i>
DCX	<i>Doublecortin</i>
DNA	Ácido Desoxiribonucleico
DSM5	Manual de Diagnóstico e Estatística para Desordens Mentais (<i>DiagnosticandStatistical Manual of Mental Disorders</i>)
gRNA	RNA guia
HDR	Reparo Dirigido Por Homologia (<i>Homology-DirectRepair</i>)
HEK	Células embrionárias de rim humano (<i>HumanEmbryonicKidney</i>)
iPSCs	Células-Tronco Pluripotentes Induzidas (<i>InducedPluripotentStemCells</i>)
KOSR	Knock Out SerumReplacement
MEA	Matriz de Multi-Eletrodos (<i>MultiElectrodeArrays</i>)
MOI	Multiplicidade de Infecção(<i>MultiplicityofInfection</i>)
Na _v	Canais de Sódio Voltagem Dependente (<i>VoltageGatedSodiumChannels</i>)
NEAA	Aminoácidos Não Essenciais (<i>Non EssentialAminoacids</i>)
NHEJ	Mecanismo de Reparação Não Homologo (<i>error-prone Non HomologousEndJoining</i>)
PAM:	Motivo Adjacente ao Protoespaçador (<i>Protospacer-Adjacentmotif</i>)
PCR	Reação em cadeia da polimerase (<i>Polimerase Chain Reaction</i>)
RNA	Ácido Ribonucleico
SMA	Actina de Músculo Liso (<i>SmoothMuscleActin</i>)
TEA	Transtornos do Espectro Autista
βIII tub	Beta III Tubulina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	NEURODESENVOLVIMENTO	13
1.2	DOENÇAS DO NEURODESENVOLVIMENTO	15
1.3	AUTISMO	15
1.4	CANALOPATIAS	17
1.4.1	Potencial de ação e atividade elétrica em neurônios	18
1.4.2	Canais de sódio	20
1.5	CÉLULAS TRONCO PLURIPOTENTES INDUZIDAS	22
1.6	CRISPR/CAS9	23
1.7	ORGANOIDES	25
2	JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE	30
3	OBJETIVOS	31
3.1	OBJETIVO GERAL	31
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
4	METODOLOGIA	32
4.1	GERAÇÃO DE iPSCs	32
4.2	CARACTERIZAÇÃO DAS iPSCs	33
4.2.1	Protocolo para geração de corpos embrioides	34
4.2.2	Imunofluorescência	34
4.2.3	Citometria de fluxo	35
4.2.4	RT-PCR	35
4.2.5	Análise de STR	36
4.3	EDIÇÃO GENÉTICA PELO SISTEMA CRISPR/Cas9	37
4.3.1	Digestão e ligação	38
4.3.2	Transformação de bactérias quimiocompetentes	38
4.3.3	<i>Colony</i> PCR	38
4.3.4	Extração de DNA plasmidial	39
4.3.5	Nucleofecção	39
4.4	GERAÇÃO DE ORGANOIDES CEREBRAIS	41
4.5	ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA POR PCR EM TEMPO REAL	42
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	42
4.7	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	42
5	RESULTADOS	43
5.1	GERAÇÃO DE IPSCS DE PACIENTE COM TEA E MUTAÇÃO NO GENE SCN2A	43

5.2	EDIÇÃO DO GENE SCN2A UTILIZANDO O SISTEMA CRISPR/Cas9	49
5.3	GERAÇÃO DE ORGANOIDES CEREBRAIS A PARTIR DE iPSCs	59
6	DISCUSSÃO	67
7	CONCLUSÃO	72
	REFERÊNCIAS	73

1 INTRODUÇÃO

1.1 NEURODESENVOLVIMENTO

O neurodesenvolvimento é um processo dinâmico e altamente complexo, orquestrado por um refinado equilíbrio de fatores ambientais, físicos, bioquímicos e genéticos. Durante a fase de gastrulação da embriogênese, as células migram para o interior do embrião e dão origem aos folhetos embrionários, endoderme, mesoderme e ectoderme. Logo após a determinação dos folhetos, células da mesoderme dão origem a um tubo alongado na região dorsal do embrião, a notocorda. Após a formação da notocorda, células da ectoderme imediatamente se organizam nessa região e dão origem à crista neural, numa fase denominada neurulação (correspondente à terceira semana da gestação). Seguindo a formação da crista neural, ocorre a formação da placa neural seguida da dobra dessa estrutura que dá origem a um tubo neural.

O tubo neural se alonga na direção rostro-caudal originando três estruturas básicas que darão origem ao cérebro: Prosencefalo, Mesencéfalo e Rombencéfalo. Nessas estruturas primárias, as células se multiplicam e o tubo neural começa a se expandir na direção dorso-ventral. Nessa etapa as células neuroprogenitoras se estabelecem em regiões internas específicas. As células neuro-epiteliais que se estabelecem junto à parede do neurotubodão originam a zona ventricular na cavidade central do tubo e as células que começam a se diferenciar migram seguindo a direção de expansão. As células neuro-epiteliais são células tronco, e como tais, se dividem assimetricamente dando origem a uma célula tronco e uma célula diferenciada, as células diferenciadas são células progenitoras de tipos celulares que compõem o sistema nervoso, como neurônios, astrócitos e oligodendrócitos. Quando os primeiros neurônios são gerados começa a formação da placa cortical.

Com o surgimento da placa cortical, uma nova camada proliferativa se forma acima da zona ventricular, sendo denominada zona subventricular. Essa zona cresce durante o desenvolvimento fetal e a proliferação de células progenitoras nessa região gera neurônios piramidais (neurônios glutamatérgicos excitatórios), que migram de forma radial dando origem às outras seis camadas corticais. Ainda na zona ventricular células neuro-epiteliais sofrem uma transição e se tornam células da glia radial, que se multiplicam e estendem

processos para formação do neocórtex, se dividindo assimetricamente em células progenitoras e neurônios. A subsequente migração e diferenciação dessas células dá origem uma série de estruturas, os giros. (Figura 1).

A formação de circuitos elétricos acontece também muito cedo, ainda durante a formação da zona ventricular. Neurônios prematuramente formados, denominados células de Cajal-Retzius formam os primeiros circuitos sinápticos e ajudam na formação laminar da placa cortical. Os neurônios seguintes, que provém da zona ventricular, são divididos em neurônios excitatórios glutamatérgicos que migram de forma radial, e interneurônios GABAérgicos que migram no sentido tangencial. Dessa forma durante o processo de migração a interação entre esses neurônios dá origem à circuitos sinápticos, que inclusive, auxiliam no processo de migração e direcionamento das células. (BUDDAY; STEINMANN; KUHL, 2015; SILBEREIS et al., 2016)

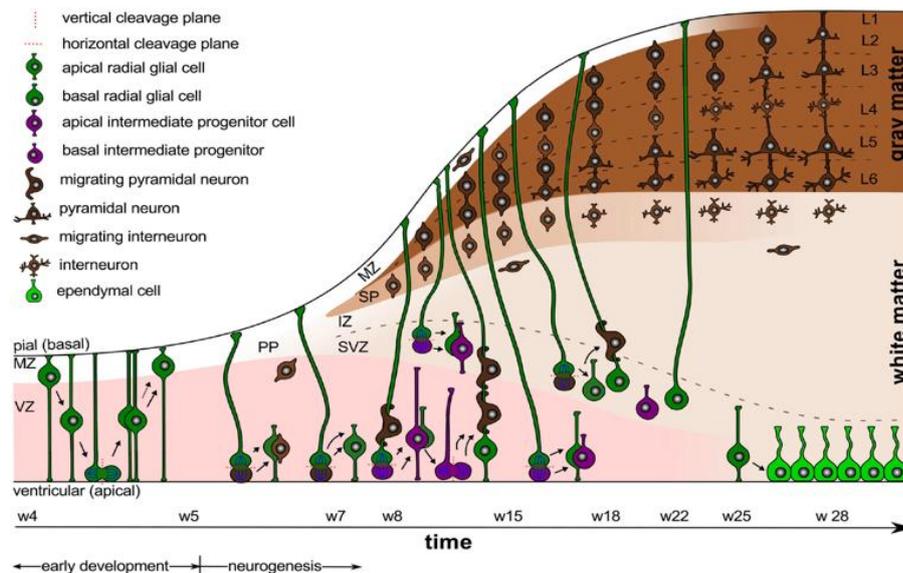


Figura 1. Migração neuronal durante o desenvolvimento cortical. O processo de migração tem início com a proliferação de células progenitoras da glia radial nas regiões basal e apical no período inicial do desenvolvimento. Essas células se organizam de modo a propiciar a migração radial de células que se diferenciam em neurônios cada vez mais maduros, como os neurônios piramidais, durante o processo de neurogênese. As células que migram na direção radial darão origem às seis camadas do córtex cerebral. Enquanto as células que migram na direção tangencial compõem a neuroglia, e interneurônios para conexão entre as diferentes camadas (Adaptado de BUDDAY; STEINMANN; KUHL, 2015).

1.2 DOENÇAS DO NEURODESENVOLVIMENTO

Doenças do desenvolvimento neurológico incluem uma variedade de doenças relacionadas a malformações do cérebro durante o período gestacional, sendo caracterizadas por deficiências na cognição, comunicação, comportamento e habilidades motoras resultantes dessa anomalia (MULLIN et al., 2013). Por abranger uma grande variedade de sintomas e depender basicamente do diagnóstico clínico, devido à ausência de biomarcadores específicos para todos os tipos de doenças relacionadas ao neurodesenvolvimento, é difícil estabelecer com precisão quantos são os indivíduos afetados, mas estima-se que 1 em cada 30 crianças seja afetada por problemas no desenvolvimento do cérebro (SONTHEIMER, 2015).

Essas doenças podem ser causadas por fatores ambientais, como exposição a toxinas, desnutrição e infecções, ou a fatores genéticos, desde alterações cromossômicas até silenciamento de genes (JOHN; BLACK; NELSON, 2017). Por se tratar de um processo complexo que envolve a regulação fina de diversos fatores, como a ativação e inativação de genes, processos de migração dependentes de gradiente de concentração, expressão de fatores de crescimento, sinalização celular e a formação de conexões celulares. Qualquer desregulação pode comprometer a formação correta das estruturas necessárias para que o cérebro seja capaz de desempenhar todas as suas funções após ser formado (SILBEREIS et al., 2016; YADAV; SRIVASTAVA, 2018). É necessário ainda ressaltar que as desordens relacionadas ao desenvolvimento do cérebro não estão restritas ao período gestacional, pois embora muitos dos eventos mais críticos aconteçam durante o período embrionário outras, como a formação de conexões sinápticas, ainda ocorrem durante o período da infância, quando pode ser observada uma espécie de regressão no desenvolvimento (ZOGHBI, 2003).

As malformações morfológicas ou a má formação de redes de interneurônios responsáveis por transmitir as informações entre as sinapses, pode levar aos problemas que afetam o desenvolvimento da criança levando à manifestação dos sintomas clínicos característicos das doenças do neurodesenvolvimento. Dentre as doenças do neurodesenvolvimento mais conhecidas estão a epilepsia, a síndrome de Down e o Autismo (SAHIN; SUR, 2015).

1.3 AUTISMO

O autismo foi descrito pela primeira vez em 1930 como uma desordem clínica que afeta a interação social e a comunicação (KANNER, 1943). Atualmente, compreende uma

série de distúrbios que são descritos como os Transtornos do Espectro Autista (TEA). Os TEA englobam um espectro de distúrbios do sistema neurológico que acometem indivíduos no estágio inicial do desenvolvimento se manifestando clinicamente até os primeiros 5 anos de vida, e inclui, por exemplo a Síndrome do X frágil e a Síndrome de Asperger (LORD, Catherine, 2006). O diagnóstico, que é realizado pelo quadro clínico, segue padrões internacionais determinados pelas normas descritas no DSM-5 (Manual de Diagnóstico e Estatística para Desordens Mentais - do inglês: *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*) e leva em consideração deficiências de interação social, comunicação, interesse restrito e comportamento repetitivo (LORD, 2006).

A pesquisa mais recente realizada em 2018 pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC-EUA) indica que, nos Estados Unidos, cerca de 1 a cada 59 crianças tenha algum transtorno do espectro autista, sendo que essa incidência é maior em indivíduos do sexo masculino numa razão de cerca de 4:1 em relação ao sexo feminino (CHRISTENSEN, 2016). O número de pacientes diagnosticados com autismo tem aumentado exponencialmente (Figura 2), o que pode estar relacionado tanto ao aumento da quantidade de indivíduos afetados, quanto ao aumento de diagnósticos que antes permaneciam indeterminados e hoje são incluídos dentro dos TEAs.

Por afetar indivíduos desde os primeiros anos de vida e gerar uma condição permanente, os danos inestimáveis na vida desses pacientes e de seus familiares, as deficiências causadas por TEAs geram também um grande impacto econômico, tanto no alto custo dos tratamentos e cuidados necessários, como homecare ou até mesmo educação especial, para estes pacientes (SAUNDERS et al., 2015; LAMSAL; ZWICKER, 2017) quanto ao fato de afetar uma parcela importante da população em idade economicamente ativa da sociedade (JÄRBRINK; KNAPP, 2001; BUESCHER et al., 2014). Não existe cura para nenhuma das doenças dentro do espectro, e os tratamentos incluem terapias para auxiliar na interação desses indivíduos com a sociedade e uso de medicamentos para tratamento de sintomas associados como convulsões (BHAT, et al., 2014).

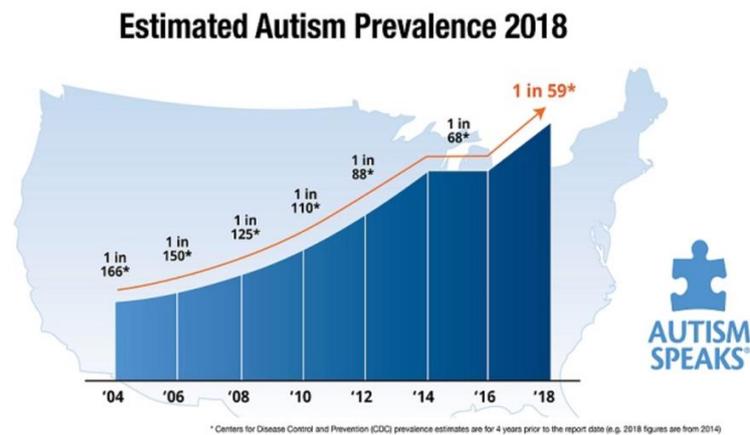


Figura 2. Prevalência estimada de autismo na população norte-americana. O gráfico demonstra o aumento exponencial da prevalência de transtornos do espectro autista na população norte-americana no intervalo de 2004 a 2018.

Fonte: CDC, 2018.

Por se tratar de uma diversidade de transtornos e não de uma única doença, existe uma grande heterogeneidade tanto na severidade dos sintomas quanto nos mecanismos moleculares que levam ao desenvolvimento dos TEA (GESCHWIND; LEVITT, 2007). Na maioria dos casos, os TEA estão associados a fatores genéticos, sendo que mais de 100 condições já foram diretamente associadas a estes transtornos, com dezenas de genes descritos como fatores de suscetibilidade (BETANCUR, 2011). As alterações genéticas descritas até então, estão relacionadas ao controle transcricional, ao remodelamento da cromatina, à síntese de proteínas, metabolismo celular, função e desenvolvimento das sinapses. Todos esses estão fatores envolvidos com o comportamento e morfologia da célula que levam a uma perda funcional e consequentes danos cognitivos durante o desenvolvimento dos pacientes (LAMB et al., 2000). Estima-se ainda que o número de casos relacionados à fatores genéticos seja ainda maior, entretanto são difíceis de ser identificados por se tratarem em sua maioria de mutações *de novo* em elementos regulatórios da atividade do cérebro fetal (SHORT et al., 2018).

1.4 CANALOPATIAS

Dentre as mutações descritas como fatores de suscetibilidade aos TEA encontram-se mutações em canais iônicos, como canais de cálcio, sódio e potássio, envolvidos no sistema e ativação e propagação de potenciais de ação pela membrana dos neurônios (SCHMUNK; GARGUS, 2013). Canais iônicos compõem diversos sistemas do organismo que dependem

de atividade elétrica como sistema cardíaco, muscular e nervoso. Mutações que levam ao mau funcionamento desses canais são denominadas canalopatias.

Canalopatias são um grupo de doenças heterogêneas que causadas pela disfunção de canais iônicos nas membranas celulares, resultando na alteração da ativação, inativação ou seletividade de um canal (SPILLANE; KULLMANN; HANNA, 2016). Apesar de origens genéticas distintas existem características fisiopatológicas comuns entre canalopatias em que os mesmos canais iônicos são afetados. Já foram descritas canalopatias associadas a convulsões, miotonia, atraso no neurodesenvolvimento, arritmias e diabetes, que levaram à definição de síndromes de múltiplos órgãos (IMBRICI et al., 2016).

Como exemplos de doenças neurológicas relacionadas a canalopatias estão descritas a síndrome de Dravet, caso grave de epilepsia caracterizado por grande número de convulsões desde o primeiro ano de vida, que está fortemente relacionado a uma mutação pontual no gene SCN1A (canal de sódio), e a síndrome da dor familiar, relacionada a mutações no gene SCN9A (canal de sódio), e caracterizado por apresentar eventos de hipersensibilidade devido a manutenção dos canais abertos por mais tempo que o necessário para condução do sinal elétrico (SWAIMAN et al., 2017). Há ainda outras doenças associadas a mutações de canais iônicos no sistema nervoso cujos sintomas incluem ataxia, enxaqueca, convulsões e paralisia.

A disfunção de canais iônicos pode afetar diretamente a fisiologia do sistema nervoso, uma vez que a geração de potenciais de ação e a propagação de sinais elétricos depende do funcionamento adequado desses canais (Figura 3) na membrana celular dos neurônios.

1.4.1 Potencial de ação e atividade elétrica em neurônios

A membrana do neurônio se mantém em equilíbrio bombeando ativamente 3 moléculas de sódio (Na) para o ambiente extracelular e 2 duas de potássio (K) para dentro da célula, mantendo assim um potencial negativo (saem 3 entram 2 íons positivos) num potencial de -70mV. Quando um estímulo é recebido, a célula é despolarizada, e o sódio entra na célula através de canais dependentes de voltagem, o influxo de sódio é tão grande que o potencial da membrana se torna positivo, +50mV. Íons de potássio começam então a sair da célula para re-equilibrar o potencial da membrana -repolarização-, os canais de sódio então se fecham, enquanto os canais de potássio abertos permitem a saída do potássio da célula.

Quando os canais de potássio se fecham, a bomba de sódio e potássio volta a bombear as moléculas de sódio para fora e as moléculas de potássio para dentro, a fim de restabelecer o potencial negativo da membrana (OpenStax, 2016) (Figura 3). A maior contribuição dos canais de sódio voltagem dependentes nesse sistema é potencializar uma ação, gerando uma corrente forte de influxo de íons que permite um pico de polarização (BEAN, 2007). Outros canais, como os canais de cálcio por exemplo, influenciam no tempo de duração da despolarização, ou na velocidade de retorno ao estado basal.

Esses estímulos elétricos permitem a troca de informações, e a formação de redes de neurônios que funcionam como circuitos integrados, armazenando informações ou desencadeando respostas. A ativação dessas redes só é possível se todos os elementos que compõem o sistema funcionarem adequadamente e de forma orquestrada.

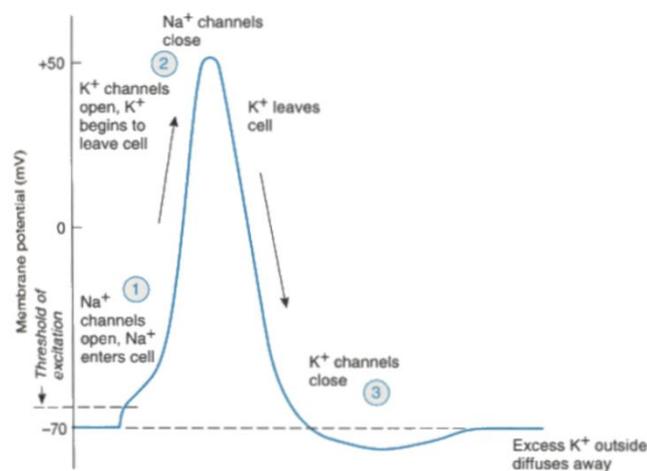


Figura 3. Dinâmica do potencial de ação em neurônios. No esquema está descrito como ocorre o potencial de ação a partir da chegada de um sinal no neurônio. O sinal deve ser forte o suficiente para superar a linha basal de excitação, em seguida: 1) Os canais de sódio se abrem e os íons de sódio entram na célula; 2) canais de potássio se abrem e os íons de potássio começam a sair da célula, enquanto os canais de sódio se fecham; 3) os íons de potássio saem da célula; e por fim o excesso de íons de potássio se difundem e a célula volta a seu estado de equilíbrio basal. Fonte: OPENSTAX, 2016.

Canalopatias já foram vinculadas a diferentes transtornos do espectro autista, e as manifestações clínicas variam a depender dos canais afetados (SCHMUNK; GARGUS, 2013). Atualmente tem se destacado um grande número de alterações nos genes que codificam partes de proteínas envolvidas no processo de iniciação e propagação dos sinais elétricos, dentre esses os genes da família SCN responsáveis pela codificação de proteínas Na_v , que formam os canais de sódio voltagem-dependente (WEISS et al., 2003).

1.4.2 Canais de sódio

Canais de sódio são estruturas proteicas pseudoheterotetrâmeras que consistem de 4 domínios, cada um composto por seis proteínas (Figura 4). A ativação do canal ocorre quando um sinal elétrico ativa um sensor de voltagem no segmento IV e dá início a mudança conformacional que leva à formação do poro central de passagem, que permite a passagem de íons de sódio. Quando o estímulo cessa a própria subunidade voltagem-dependente bloqueia o poro pela parte intracelular da membrana, numa inativação rápida, enquanto que a inativação total, que implica no retorno da conformação inicial, ocorre após a repolarização da membrana (SANDERS, et al., 2018).

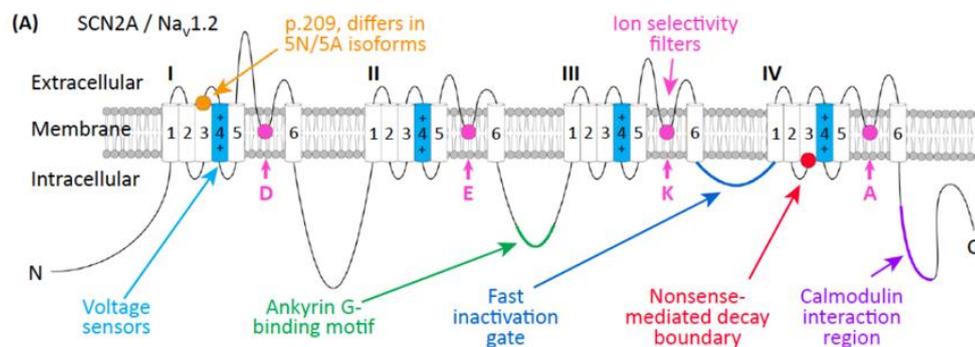


Figura 4. Estrutura do canal de sódio voltagem-dependente $Na_v1.2$. O canal, que está presente na membrana celular, é composto por diversas subunidades funcionais relacionados à sensibilidade à voltagem, sítios de ligação de proteínas, sítios de ativação rápida, filtro seletivo para íons e região de integração com calmodulina. O funcionamento de todas as estruturas é indispensável para que o canal de sódio possa exercer suas funções de forma completa. Fonte: SANDERS, et al., 2018.

Dentre os genes da família SCN, o SCN2A tem sido alvo para estudo de doenças do espectro autista (TAVASSOLI, et al, 2014). O SCN2A é um gene encontrado em humanos no cromossomo 2 próximo aos genes do SCN1A e SCN9A, e codifica a proteína $Na_v1.2$. O SCN2A é expresso principalmente na fase inicial do desenvolvimento, principalmente em neurônios piramidais, no segmento inicial do axônio. Após o segundo trimestre de gestação até o segundo ano de vida os canais $Na_v1.2$ (que necessitam de maior energia de ativação) são substituídos pelos canais $Na_v1.6$ (que respondem a energia de ativação mais baixa), codificados pelo gene SCN8A, ao longo do axônio, mas se mantém expresso próximo ao soma. A manutenção da expressão do $Na_v1.2$ influencia a transcrição gênica, a integração e a plasticidade em sinapses (HU et al., 2009).

A mutação do gene SCN2A já foi descrita como causadora da epilepsia em casos de ganho de função, quando há um excesso de produção da proteína, pois devido ao papel desse canal na propagação da atividade elétrica, esse aumento de produção de SCN2A está associado ao desencadeamento de convulsões (DILENA et al. 2017). Entretanto, apenas recentemente foi evidenciado através de estudos de sequenciamento completo do genoma de pacientes acometidos por doenças do espectro autista que as mutações missense e de perda de função do gene SCN2A um possível papel dos fatores relacionados aos TEA (YUEN et al., 2017; SANDERS et al., 2015). Estudos *in vitro* de células modificadas para expressar as versões mutantes do gene SCN2A demonstraram que de fato as mutações missense (mudança de um nucleotídeo) e nonsense (mudança de um nucleotídeo que resulta num códon de parada prematuro) do gene levam à redução da excitabilidade dos neurônios. A confirmação desse fator de risco tornaria o gene SCN2A um dos maiores candidatos a indicadores dos transtornos do espectro autista, ficando atrás apenas do indicador da síndrome do X frágil (BEN-SHALOM et al., 2017).

Em estudos mais recentes da mutação do gene SCN2A foram utilizadas células imortalizadas da linhagem HEK293 e mutações escolhidas a partir de um banco de dados de sequências genômicas (BEN-SHALOM et al., 2017). Embora sejam células humanas, as células HEK293 são provenientes de rim embrionário (do inglês: HumanEmbryonicKidney), e não representam de maneira alguma a complexidade e a expressão de proteínas e genes de um neurônio.

Estudos visando analisar mutações no SCN2A em camundongos indicaram a presença de sinapses imaturas funcionalmente e estruturalmente em indivíduos adultos, uma redução da excitabilidade dendríticas e sugerem um decaimento na aprendizagem e socialização dos animais (SPRATT et al., 2018). No entanto estudos em outras espécies embora informativos não representam fielmente a fisiologia humana, principalmente considerando doenças do desenvolvimento neurológico, que se dá de modo distinto entre humanos e murinos (SILBEREIS et al., 2016).

Desse modo, se faz necessário o estabelecimento de modelos que utilizem as células do sistema nervoso em sistemas que simulem o processo de neurodesenvolvimento em toda sua complexidade, incluindo diversidade, migração e atividade celular. Contudo, diferentemente de outros tecidos de fácil obtenção e manipulação, o isolamento e manutenção de células do sistema nervoso é altamente invasivo e complexo. A utilização de células

embrionárias ou fetais em pesquisas estão associadas a questões éticas e regulatórias complexas que praticamente inviabilizariam o desenvolvimento de pesquisas na área de doenças do neurodesenvolvimento. Entretanto, novas tecnologias descritas recentemente tornaram possível a superação destas barreiras, através da descrição dos métodos de reprogramação celular e obtenção de células-tronco pluripotentes a partir de células somáticas.

1.5 CÉLULAS TRONCO PLURIPOTENTES INDUZIDAS

O estudo de células e tecidos de difícil obtenção tem avançado amplamente desde a descobertas células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs), tecnologia que rendeu o prêmio Nobel de Medicina ao pesquisador Shinya Yamanaka em 2012 e tornou possível a obtenção de células-tronco pluripotentes a partir de células somáticas. A tecnologia de geração de iPSCs parte do princípio de que todas as células adultas do organismo - que possuem núcleo diplóide e não realizam recombinações gênicas - contém toda a informação do genoma, e que a diferença entre as funções exercidas por cada célula resulta do padrão de genes expressos que determinam não apenas a sua função, mas também seu estágio de maturação. As iPSCs são obtidas a partir da reprogramação de células somáticas, tais como fibroblastos, células mesenquimais ou eritroblastos, dentre outras, que são revertidas ao estado de pluripotência utilizando fatores que induzem a mudança de expressão gênica e alteram as características morfológicas e funcionais das células, fazendo com que elas se tornem pluripotentes (TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006; TAKAHASHI et al., 2007).

Após passarem pelo processo de reprogramação, as células que antes estavam comprometidas com uma função definida e possuíam capacidade de diferenciação limitada se tornam capazes de se diferenciar em células dos três folhetos germinativos: endoderme, mesoderme e ectoderme, como acontece com as células-tronco embrionárias (ROBINTON; DALEY, 2012). A possibilidade de reprogramar células de qualquer pessoa, mantendo o perfil genético do doador, permite a produção de células que apresentem alterações genéticas características de determinadas doenças e que, quando induzidas à diferenciação em células dos tecidos específicos acometidos por essas doenças, podem ser utilizadas na investigação de vias envolvidas na patogênese da doença e no desenvolvimento de terapias específicas (Figura 5). Portanto, o uso de iPSC para o estudo de doenças neurais é de grande interesse, pois não requer procedimentos invasivos ou uso de células embrionárias, e permite estudos fidedignos com células especificamente relacionadas às doenças neurológicas que podem ser derivadas

das iPSCs, mantendo as características genéticas dos pacientes cujo fenótipo já foi determinado (VIGONT et al., 2018; KIMURA et al., 2018 ; COBB et al., 2018).

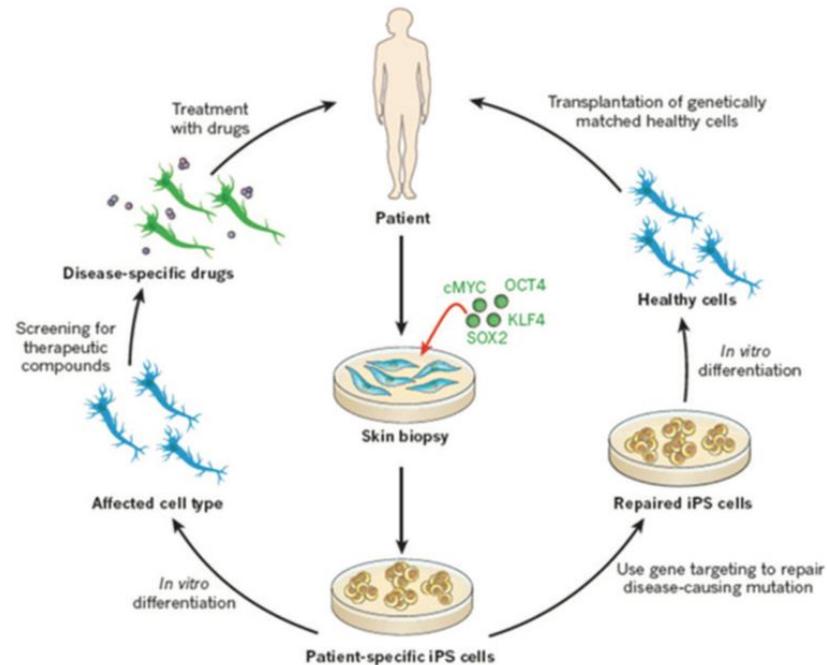


Figura 5. Métodos para obtenção de iPSC, diferenciação celular, edição gênica e suas aplicações em pesquisa. Células adultas obtidas de pacientes podem ser reprogramadas em células pluripotentes e utilizadas com finalidade de desenvolvimento de estudos in vitro, como teste de drogas ou com finalidade clínica através da edição gênica e transplante em pacientes. Fonte: TAKAHASHI et al., 2007.

O uso de iPSC para o estudo de doenças genéticas relacionadas ao neurodesenvolvimento é uma importante ferramenta para identificação de fenótipos celulares e moleculares relacionados aos distúrbios e permite a identificação de biomarcadores, como fatores genéticos, que possam ser utilizados para otimização do diagnóstico e tratamento dos pacientes (MCKINNEY, 2017). Além disso, ter à disposição células que podem ser expandidas em grandes quantidades e diferenciadas conforme a necessidade propicia o desenvolvimento de estudos em larga escala, como estudos comparativos de transcriptoma, ou podem até mesmo ser utilizados como modelos pré-clínicos para teste de drogas (LIN; LACHMAN; ZHENG, 2016).

1.6 CRISPR/Cas9

Outra tecnologia que pode auxiliar no estudo de doenças genéticas é um sistema de edição genética de alta precisão baseado no sistema imune de bactérias, que foi recentemente

descrito por Zhang e colaboradores (RAN et al., 2013). O sistema denominado CRISPR-Cas9 (CRISPR é uma abreviação do inglês para *clustered regularly interspaced short palindromic repeat*) e se baseia na resposta imunológica de bactérias a infecções por vírus. As bactérias produzem pequenas sequências de RNA (RNA guia, ou gRNA) que são capazes de reconhecer sequências palindrômicas curtas, regiões cuja sequência de nucleotídeos é lida da mesma forma independente do ponto de partida (5'-3' ou 3'-5').

Uma vez que uma sequência palindrômica é encontrada, o fragmento de RNA é capaz de reconhecer e se anelar na região identificada. A enzima Cas9 reconhece então a ligação, e se ancora em uma sequência de três nucleotídeos adjacente à ligação (sequência PAM do inglês: Protospacer-Adjacentmotif), causando a quebra daquela sequência, impedindo que a mesma seja transcrita e traduzida para originar novos vírus que causariam o colapso da bactéria (WILKINSON et al., 2018). Um sistema composto por esses mesmos componentes pode reconhecer sequências no genoma de organismos mais complexos e realizar a clivagem do DNA em sítios específicos, constituindo uma ferramenta para induzir uma mutação num ponto conhecido do genoma (NHEJ, do inglês *error-prone Non Homologous EndJoining*), ou ser seguida por um reparo utilizando uma construção genética de correção que, por homologia, se liga à região clivada (HDR do inglês *Homology-DirectRepair*). Dessa forma, o uso da tecnologia Crispr/Cas9 permite a deleção, troca ou inserção de uma sequência genética num sítio específico (MEMI; NTOKOU; PAPANGELI, 2018) (Figura 6).

No campo de estudo de doenças genéticas e células tronco, esse tipo de ferramenta de edição gênica permite que sejam geradas células com o mesmo *background* genético do paciente com mutações específicas não apenas no gene, mas, precisamente no local exato da mutação. Desse modo é possível gerar controles isogênicos, induzindo alterações gênicas em células saudáveis ou ainda corrigindo alterações presentes em células de pacientes, que podem ser utilizadas em experimentos *in vitro* como controles dele mesmo, tornando possível estudar quais os efeitos específicos causados pela mutação na atividade celular (XU et al., 2017). Além disso é possível realizar o estudo de doenças genéticas raras em células de doadores saudáveis, introduzindo no seu genoma mutações conhecidas relacionadas a essas doenças, permitindo o aumento do número de indivíduos analisados, e a comparação entre a atividade e metabolismo celular e expressão gênica de células de pacientes e células nas quais a mutação foi induzida (TIDBALL et al., 2017).

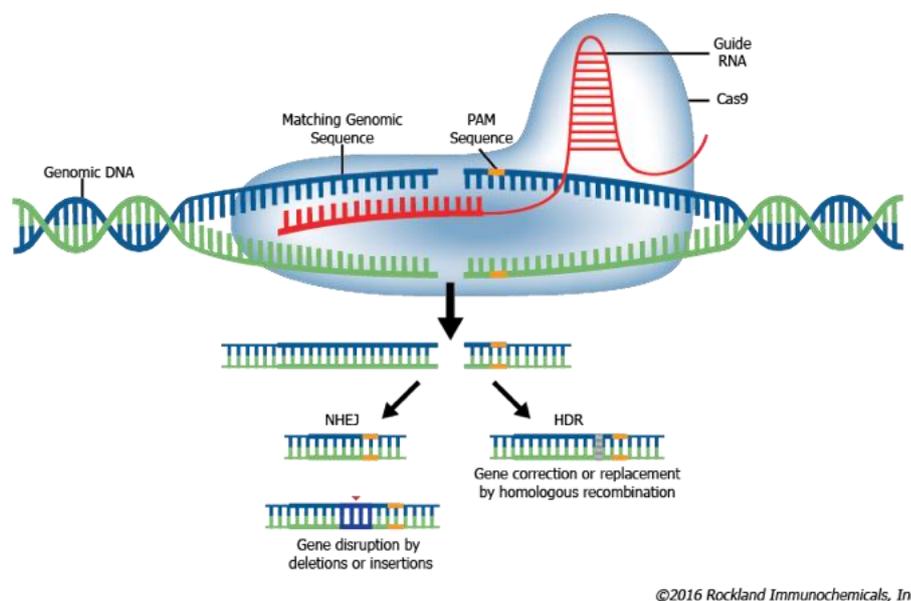


Figura 6. Métodos de edição gênica utilizando CRISPR/Cas9. O sistema CRISPR/Cas9 permite a edição precisa de um locus específico através do uso de um RNA como guia para região da edição. Uma vez detectado o sítio de clivagem a enzima Cas9 realiza a quebra da fita de DNA que pode ser auto reparada gerando deleções, inserções ou mutações, ou especificamente editada através de recombinação homóloga utilizando um template de DNA sintetizado. Fonte: Rocklandimmunochemicals, 2006.

1.7 ORGANOIDES

Uma outra ferramenta que foi desenvolvida a pouco tempo e tem se tornado valiosa para estudos do desenvolvimento e testes de fármacos em larga escala são os organoides. Organoides são estruturas tridimensionais derivadas tanto de células-tronco adultas quanto de células-tronco pluripotente induzidas, se assemelhando a uma grande variedade de órgãos e mimetizando suas funções e padrão de organização, contribuindo para estudos *in vitro* da fisiopatologia de doenças (DIXON; WOODWARD, 2018). Os organoides derivados de iPSCs são uma grande promessa no campo de estudo das doenças do desenvolvimento, uma vez que durante o processo de diferenciação estas células recapitulam o desenvolvimento do tecido semelhante ao que ocorre durante a formação do embrião, como a arquitetura do tecido, migração e atividade das células (EGLIN; REISINE, 2018).

Os organoides têm sido utilizados na modelagem de doenças, identificação de alvos terapêuticos, testes de drogas e testes de toxicidade, possibilitando o desenvolvimento de tratamentos mais eficazes e tornando possível o desenvolvimento de uma medicina “personalizada”. No que se refere ao estudo de doenças do neurodesenvolvimento, os organoides cerebrais são uma ferramenta de uso inestimável, pois permite que seja visualizada

in vitro a formação das estruturas de modo semelhante ao que acontece no início do período gestacional (TRUJILLO; MUOTRI, 2018), recapitulando o desenvolvimento embrionário até os primeiros 4 meses de gestação (Figura 7) (KELAVA; LANCASTER, 2016). Nesse período por exemplo, é possível observar nos organoides a formação das rosetas neurais, da placa cortical e, com o amadurecimento do organoide, a formação de algumas das camadas ventriculares e corticais. Também é possível acessar a grande riqueza de populações celulares que compõem o cérebro, como os diversos tipos de neurônios, em diferentes graus de maturação, além das células de suporte como astrócitos e oligodendrócitos. É possível ainda acessar a atividade elétrica dessas células (QUADRATO, Giorgia et al., 2017) e a formação de circuitos neurais através do uso de microeletrodos em plataformas MEA (do inglês *multielectrodearray*) (TRUJILLO. et al., 2018).

Organoides cerebrais já têm sido utilizados para o estudo de doenças neurais desde a primeira vez que foram descritos (LANCASTER et al., 2013). Diversos outros trabalhos descrevem modificações no protocolo de geração de organoides cerebrais visando otimizar a reprodutibilidade entre experimentos (WATANABE, et al., 2017), ou no enriquecimento de populações celulares de interesse (MADHAVAN et al., 2018). De toda forma, os protocolos estabelecidos para diferenciação em organoides cerebrais levam em consideração a indução da diferenciação em neuroectoderme, e permitem a sinalização celular e a auto-organização das estruturas (Figuras 7 e 8).

O autismo é uma das doenças que vêm sendo estudadas com a ferramenta dos organoides cerebrais (WANG et al., 2015; MARIANI et al., 2015; AMIRI, et al., 2018). Por ser um conjunto de doenças fortemente relacionado a fatores genéticos, o estudo de doenças do transtorno do espectro autista se beneficia da tecnologia das iPSCs, podendo reproduzir um modelo paciente-específico, cujo fenótipo é conhecido, e da tecnologia dos organoides, que permite o estudo da fisiopatologia do paciente *in vitro*, analisando o tecido de interesse, o tecido neural cerebral, durante o período de desenvolvimento em que ocorrem os eventos de migração celular e formação dos circuitos neurais, nos primeiros meses da gestação.

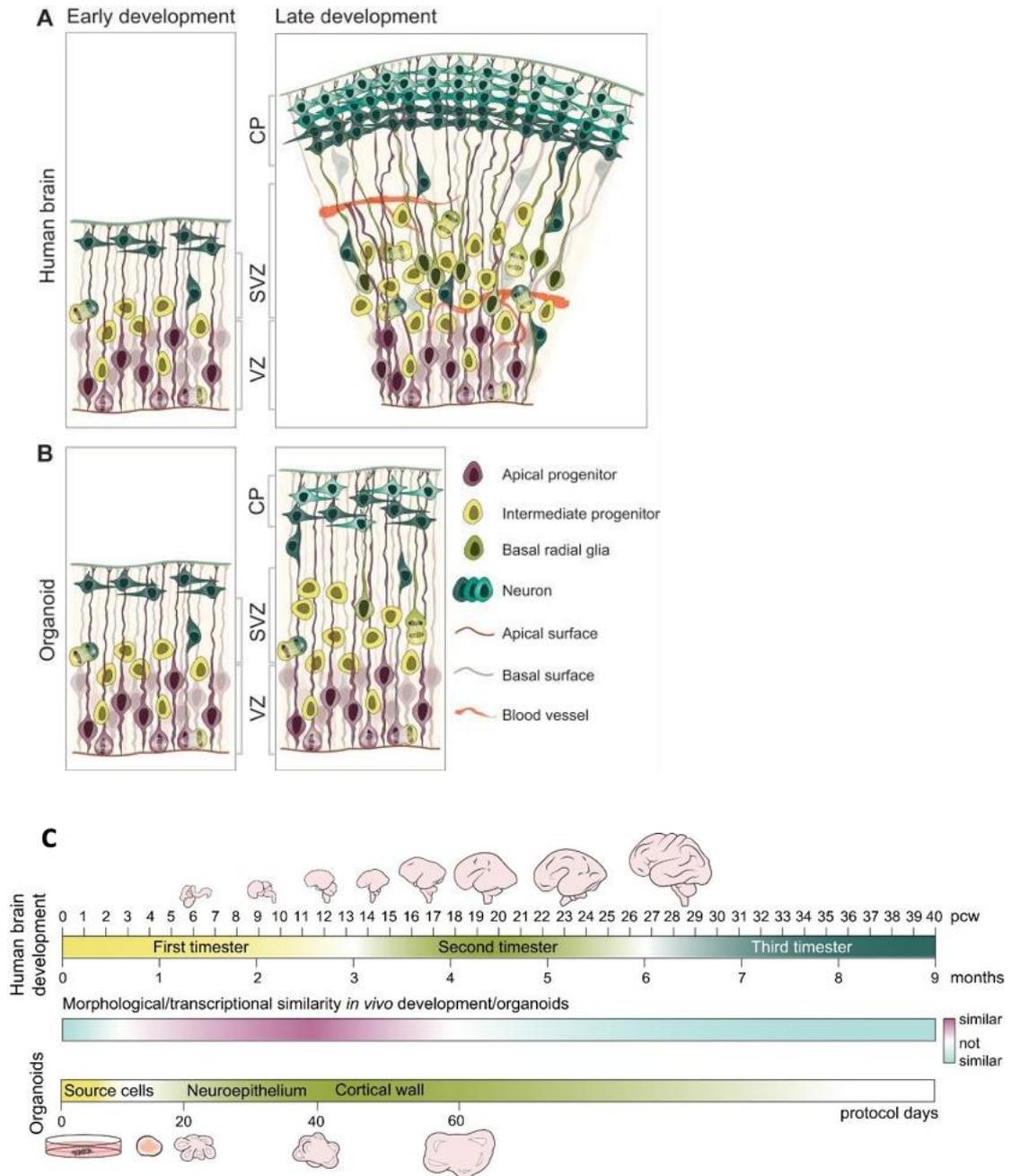


Figura 7. Estágios de maturação dos organoides cerebrais e sua correlação com o desenvolvimento do cérebro humano. Durante o neurodesenvolvimento ocorre a migração celular e a formação de estruturas que definem o funcionamento do cérebro. A) Migração e formação das estruturas de zona ventricular, zona subventricular e placa cortical em cérebros humanos; B) Organização dessas mesmas estruturas em organoides cerebrais gerados *in vitro* a partir de iPSC; C) Comparação morfológica e temporal do desenvolvimento das estruturas entre cérebros e organoide. Fonte KELAVA; LANCASTER, 2016.

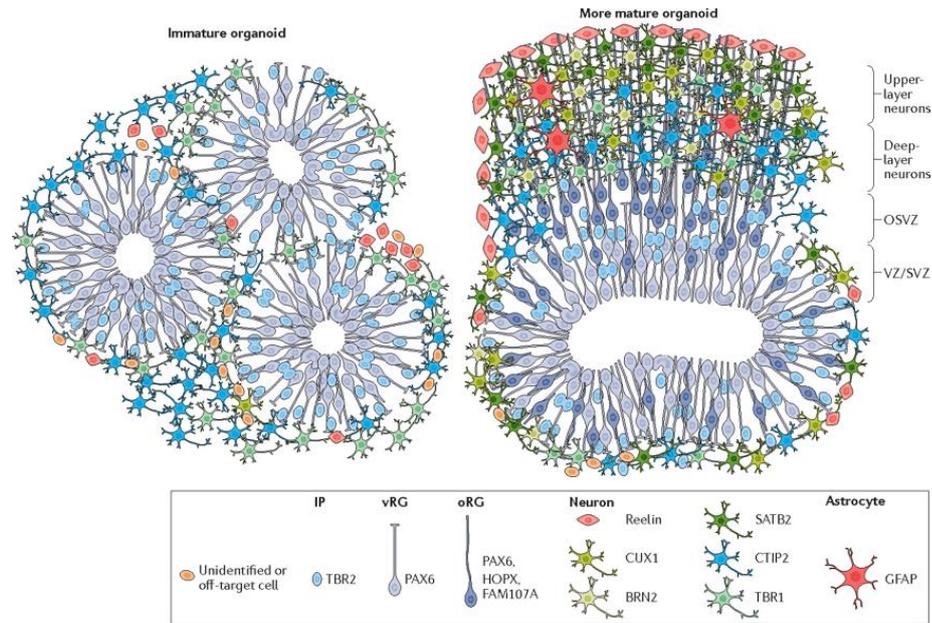


Figura 8. Diversidade celular presente em organoides cerebrais em diferentes estágios de maturação. Os organoides são compostos inicialmente por uma população de células progenitoras neurais. Conforme ocorre o processo de maturação, as células migram e se diferenciam nos diversos tipos celulares que compõem o cérebro, como astrócitos e diversos tipos de neurônios, além de dar origem a estruturas mais complexas, como zonas ventriculares. Fonte: DI LULLO; KRIEGSTEIN, 2017.

Considerando todos os obstáculos enfrentados para o desenvolvimento de estudos sobre doenças do neurodesenvolvimento utilizando modelos e métodos mais clássicos, faz-se necessário o emprego das novas tecnologias como ferramentas que tornem possível elucidar os mecanismos envolvidos nessas doenças e que possam ser utilizados para desenvolvimento de novas terapias. O uso combinado das ferramentas de iPSCs, CRISPR e dos organoides cerebrais se mostra promissor para a realização destes estudos. Combinadas essas tecnologias permitem a criação de controles confiáveis, devido à preservação do background genético dos doadores, que é tão relevante para o desenvolvimento de estudos de doenças com base genética, como é o caso de alguns dos transtornos descritos dentro do espectro autista (CHOI et al., 2017) (Figura 9).

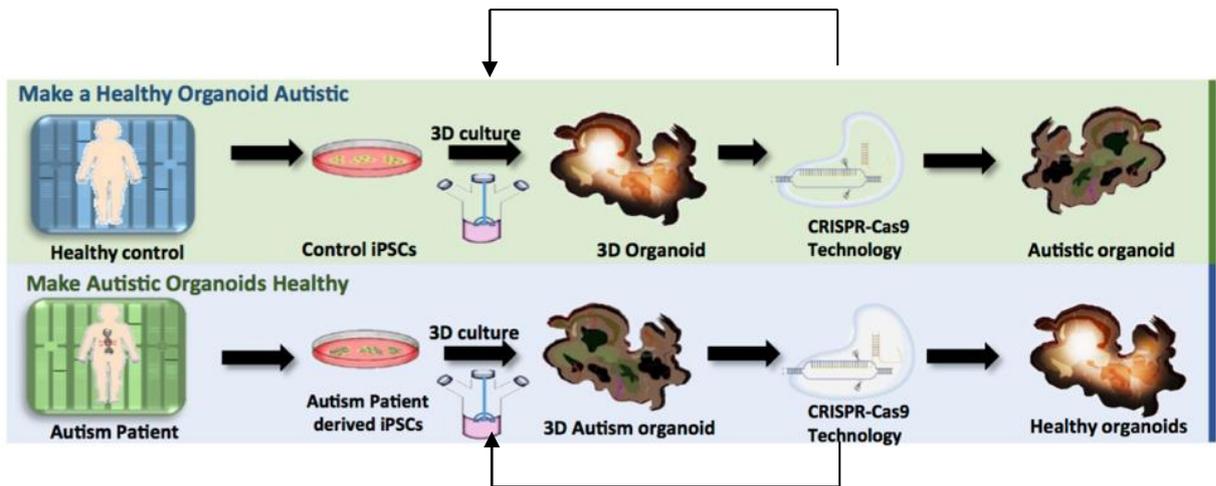


Figura 9. Aplicações de organoides cerebrais e tecnologia CRISPR/Cas9 para o estudo do autismo. O uso integrado das tecnologias de iPSC, organoide e CRISPR/Cas9 permite a investigação do papel das mutações na fisiopatologia de doenças do neurodesenvolvimento através dos estudos experimentais utilizando controles isogênicos. Fonte: adaptado de CHOI et al., 2017.

2 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

Nosso trabalho buscou estabelecer ferramentas que possam ser utilizadas para desenvolver estudos de doenças do neurodesenvolvimento, nesse caso especificamente, doenças do transtorno do espectro autista causadas por mutação de perda de função no gene SCN2A. Vale ressaltar que, embora sugestivo por associações estatísticas, nunca foi comprovado que mutações no gene SCN2A estão diretamente relacionadas aos TEA, e não há descrição na literatura do quadro dos pacientes portadores de mutações *nonsense* *missense* desse gene relacionados a autismo. A hipótese deste trabalho é que variantes patogênicas no gene SCN2A podem levar ao TEA por comprometer etapas iniciais do desenvolvimento neural, incluindo a migração neuronal e sinaptogênese, que podem ser modeladas utilizando iPSCs e organoides cerebrais. Hipotetizamos ainda que estas ferramentas são adequadas para o estudo de alterações no SCN2A, já que este gene é expresso no início do desenvolvimento cerebral, devendo ser também expresso nos organoides, permitindo assim análises de correlação genótipo-fenótipo. O estabelecimento de uma plataforma para análise *in vitro* do nível de expressão da proteína Na_v1.2, da migração celular e formação da placa cortical e de circuitos, possibilita a detecção da etapa do desenvolvimento que pode ser mais afetada e, conseqüentemente, o estabelecimento de uma relação de causalidade, assim como o desenvolvimento de terapias com alvos mais precisos. As técnicas aqui padronizadas consistem em: 1) geração de iPSC de paciente portador de TEA e mutação provavelmente patogênica no gene SCN2A, permitindo a geração de um estoque de células que podem ser expandidas indeterminadamente e mantém todas as características genéticas, podendo ser diferenciada em quaisquer dos tipos celulares de interesse envolvidos na doença; 2) a geração de controles isogênicos a partir da correção da mutação nas células afetadas através do sistema CRISPR/Cas9, a fim de observar se há resgate do fenótipo normal; 3) geração de linhagem de iPSC *knockout* para SCN2A a partir de doador saudável submetido à edição genômica com CRISPR/Cas9 direcionado ao mesmo locus da mutação da paciente afetada, com o objetivo de observar se a indução da mutação é capaz de gerar alterações nas funções das células obtidas a partir dessas iPSC; 4) padronização de um sistema de geração de organoides que permitirá analisar o comportamento de cada uma dessas linhagens durante o período inicial do desenvolvimento, a formação de estruturas, os níveis de expressão do gene SCN2A e da proteína Na_v1.2, para determinar se as mutações no gene são capazes de gerar problemas na formação de redes de conexões neurais, ou ainda problemas estruturantes alterando a morfologia das estruturas primárias do cérebro.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Estabelecer uma plataforma que permita a investigação do impacto da mutação do gene SCN2A sobre as fases iniciais do neurodesenvolvimento.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Gerar e caracterizar células tronco pluripotente induzidas de paciente autista com mutação no gene SCN2A;
- Padronizar protocolo de edição genética utilizando o método CRISPR/Cas9;
- Gerar linhagem controle isogênica através do método de correção da mutação utilizando o sistema CRISPR/Cas9 a partir das células de paciente;
- Induzir mutação no gene SCN2A em células de doador saudável utilizando o sistema CRISPR/Cas9;
- Padronizar protocolo de diferenciação de organoides cerebrais;
- Avaliar a expressão de SCN2A em organoides cerebrais.

4 METODOLOGIA

4.1 GERAÇÃO DE iPSCs

Foi identificada uma paciente do sexo feminino cujo quadro clínico permitiu o diagnóstico de TEA, seguindo as normas do DSM-5. Foi realizado sequenciamento por exoma nas células da paciente, identificando a presença de uma mutação pontual em heterozigose no gene SCN2A, na posição chr2:165344558, com substituição C>T, que insere um códon de parada (c.2566C>T;p.Arg856Ter*CCDS33313.1), interrompendo precocemente a tradução da subunidade alfa da proteína Na_v1.2 (Figura 10). As células mesenquimais da medula óssea dessa paciente foram obtidas do biorrepositório do Hospital São Rafael.

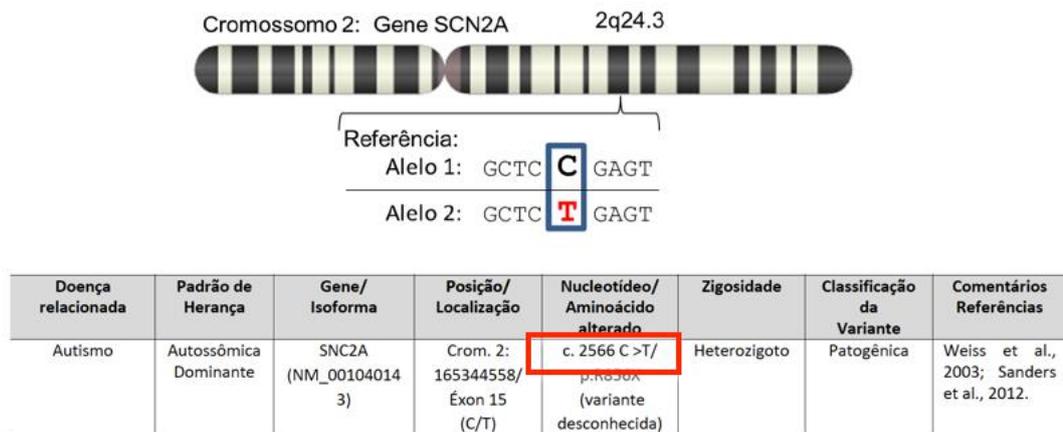


Figura 10. Exame de sequenciamento do exoma realizado em paciente portadora de TEA. O resultado indica uma mutação pontual em heterozigose no gene SCN2A, no cromossomo 2, éxon 15 posição chr2:165344558 onde há uma substituição de uma citosina por timina, inserindo um códon de parada nesta região (Adaptado do exame de diagnóstico da paciente).

As células-tronco mesenquimais foram cultivadas em DMEM com 10% de soro bovino fetal (SBF) e mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. As células foram dissociadas com tripsina-EDTA, ressuspensas em DMEM 10% SBF, centrifugadas a 1500 RPM por 5 minutos, e, após descarte do sobrenadante, o pellet contendo as células foi ressuspenso em DMEM 10% SBF para contagem da densidade celular com o auxílio de uma câmara de Neubauer. Um volume correspondente a 2 x 10⁵ células foi plaqueado por poço de placas de 6 poços, e mantidas na estufa *overnight* para aderência das células. No dia seguinte, denominado D0 da reprogramação, as células foram infectadas com o kit de Sendai Virus 2.0 (ThermoFisherScientific), utilizando duas multiplicidades de infecção (MOI): 10:10:6 e 5:5:5 dos vírus hCOS, cMYC e KLF4 (Kit Cytotune 2.0, ThermoFisherScientific) respectivamente,

diluídos em 2 ml de meio DMEM contendo SBF a 10%. No dia seguinte (D1), o meio foi trocado por meio DMEM 10% SBF fresco. No D2, o meio substituído por DMEM contendo 10% de SBF suplementado com butirato de sódio (NaBut) a 0,5 mM e o meio foi trocado a cada dois dias mantendo o NaBut até o D7.

No D8, as células foram tripsinizadas e plaqueadas em poços da placa de seis poços tratadas com Matrigel (Corning), o meio base utilizado para plaquear as células passou a ser mTeSR (Stemcelltechnologies) e foram testadas 3 condições:

1. PD0325901 a 0,5 μ M+ SB431542 a 2 μ M
2. Tiazovivina a 0,5 μ M + PD0325901 a 0,5 μ M + SB431542 a 2 μ M
3. NaBut a 0,5mM +Tiazovivina a 0,5 μ M + PD0325901 a 0,5 μ M+ SB431542 a 2 μ M

As moléculas Tiazovivina, PD0325901 e SB431542 foram adicionadas na cultura com o intuito de aumentar a eficiência da reprogramação, conforme descrição prévia (LIN, Tongxiang et al., 2009). As células foram mantidas em estufa a 37°C 5%CO₂, com trocas de meio diárias, mantendo as moléculas entre D8-D14.

A partir do D15, foi possível observar o aparecimento de colônias nas culturas em apenas algumas condições. As células foram então dissociadas com Accutase (StemCell Technologies), e o volume recuperado foi replaqueado em 24 poços de uma placa de 24 poços pré-tratada com Matrigel. O inibidor da Rhoquinase Y-27632 foi adicionado ao meio nas primeiras 24 horas após a passagem, sendo removido na troca de meio subsequente. As células foram mantidas em mTeSR1 com trocas de meio diárias e foi observada a presença de ao menos uma colônia em cada um dos poços. 10 colônias foram selecionadas, expandidas e criopreservadas (em meio contendo 10% de DMSO) e quatro foram caracterizadas por imunofluorescência para demonstrar a expressão de marcadores de pluripotência.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DAS iPSCs

As células reprogramadas foram caracterizadas por imunofluorescência, citometria de fluxo e PCR, quanto a expressão de marcadores de pluripotência. A capacidade de diferenciação em células dos três folhetos embrionárias foi confirmada por ensaio de formação de corpos embrioides, seguido de análises de imunofluorescência e RT-PCR. Neste trabalho utilizamos iPSCs de dois doadores sadios (EB4 e EA1), além da linhagem obtida de paciente autista (iM5).

4.2.1 Protocolo para geração de corpos embrioides

Com o objetivo de comprovar a pluripotência dos clones obtidos, foi necessário demonstrar sua capacidade em se diferenciar em células dos três folhetos embrionários. Para induzir essa diferenciação, as células foram dissociadas utilizando Accutase, centrifugadas e ressuspensas em meio para diferenciação de corpos embrioides composto por DMEM F12 suplementado com KSR a 20% (*knock-out serumreplacement*), 1x Glutamax, 1x aminoácidos não essenciais (NEAA), 1x B-mercaptoetanol e 1x antibiótico (Penicilina/Streptomicina), além do fator de crescimento recombinante humano bFGF na concentração de 4ng/ μ L (todos os reagentes ThermoFisherScientific). As células foram contadas com auxílio de uma câmara de Neubauer e 10^5 células foram plaqueadas com placas de 96 poços com fundo em U não aderentes (Corning). Alternativamente, placas Aggrewell foram utilizadas para agregação das iPSCs e formação de corpos embrioides, seguindo o protocolo disponibilizado pelo fabricante (StemCellTehcnologies). No dia da passagem o inibidor da Rhoquinase Y-27632 foi adicionado ao meio, e dois dias após o meio foi trocado sem adição da molécula. Após dois dias de cultivo já foi possível observar a formação de pequenas esferas, e após uma semana as esferas foram transferidas para placas de 24 contendo lamínulas de vidro recobertas por matrigel. As células migraram das esferas para as lamínulas e mantidas em cultura no mesmo meio de EBs por mais uma semana, ou até atingir confluência necessária. As células foram submetidas à imunofluorescência ou extração de RNA para PCR.

4.2.2 Imunofluorescência

As células foram cultivadas em placas de 24 poços contendo lamínulas de vidro recobertas por matrigel. Quando a confluência desejada foi atingida as células foram lavadas com PBS e fixadas com PFA 4% por 15 minutos. Posteriormente as células foram lavadas novamente com PBS, e bloqueadas com PBS/BSA 5%. Os anticorpos primários foram diluídos em PBS/BSA1% adicionados aos poços e incubados na geladeira a 4°C *overnight*. No dia seguinte os poços foram lavados 3 vezes com PBS/Tween e 1 vez com PBS, e incubados com os anticorpos secundários diluídos em PBS por 1 hora à temperatura ambiente. Em seguida os poços foram lavados e as lamínulas foram montadas com DAPI em lâminas de microscópio. Foram utilizados anticorpos primários para avaliação dos seguintes marcadores pluripotência: Tra1-60, Oct4, Sox2 e Nanog. Os anticorpos utilizados para marcação da diferenciação dos folhetos embrionários foram: AFP (Zymed) - endoderme, β III tub (Santa Cruz Biotechnology) - ectoderme, alfa-SMA (Sigma) - mesoderme. A relação dos anticorpos

primários e secundários utilizados nas análises de imunofluorescência estão descritos na Tabela 1.

4.2.3 Citometria de fluxo

Para realização da citometria as células foram dissociadas com Accutase, lavadas com PBS, centrifugadas e ressuspensas em PBS. Os anticorpos foram diluídos em PBS, adicionados às células em suspensão, incubados por 30 minutos. Foram utilizados anticorpos para detecção dos marcadores de pluripotência Tra1-60 e SSEA4, conjugados a APC e PE-CF594 (BD Biosciences) respectivamente. Em seguida foram feitas duas lavagens com PBS, seguida pela aquisição no citômetro de fluxo (Fortessa, BD Biosciences). Ao menos 10.000 eventos foram adquiridos e analisados utilizando o software BD FACS DIVA 6.2.

4.2.4 RT-PCR

A primeira etapa consistiu na extração do RNA das células. As células foram dissociadas da placa utilizando Accutase, ressuspensas em meio mTeSR1 e centrifugadas a 750 RPM por 5 minutos quando foi observado um pellet de células. O pellet foi ressuspenso em 700 μ L de TRIzol (Thermo Fisher Scientific), e colocado no gelo. Foram adicionados 250 μ L de clorofórmio ao tubo, que foi agitado manualmente e centrifugado a 14000 RPM por 20 minutos para separação de fases. A fase aquosa transparente foi pipetada para um tubo contendo isopropanol gelado, homogeneizada e mantida a -80°C *overnight*. No dia seguinte, o tubo foi descongelado e centrifugado a 14000 RPM por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e foi possível observar um pellet no fundo do tubo. Foi feita uma lavagem com etanol a 75%, também centrifugado a 14000 RPM por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e pellet foi deixado para secar em temperatura ambiente. Após secar, o pellet foi ressuspendido em água e mantido a -80°C . O RNA extraído foi quantificado, e processado utilizando kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific), para produção de cDNA seguindo orientações do fabricante do kit. As reações foram realizadas utilizando os *primers* listados na Tabela 2.

Tabela 1. Tabela de Anticorpos

Anticorpo	Marca	Diluição
Primários		
Sox2	Santa Cruz	1:300
Tuj-1	Chemicon	1:300
DCX	Santa Cruz	1:300
NKX2.1	Abcam	1:400
FOXG1	Abcam	1:300
NAV1.2	ThermoFisher	1:400
OCT 4	Abcam	1:500
TRA 1-60	Abcam	1:500
SMA	Dako	1:300
AFP	Innovative	1:300
Secundários		
Goat anti-Mouse IgM Alexa Fluor 488	ThermoFisher	1:1000
Goat anti-Mouse IgG Alexa Fluor 488	ThermoFisher	1:1000
Goat anti-Rabbit IgG Alexa Fluor 488	ThermoFisher	1:1000
Donkey anti-Rabbit IgG Alexa Fluor 568	ThermoFisher	1:1000
Rabbit anti-Goat IgG Alexa Fluor 568	ThermoFisher	1:1000

4.2.5 Análise de STR

Para confirmação da identidade celular das linhagens de iPSC geradas, foram realizadas análises de STR (do inglês, short tandem repeats) comparando os marcadores das células de origem com as linhagens geradas. Para tanto, foi utilizado o kit Puregene Core (Qiagen) para purificação do DNA, seguindo as instruções do fabricante. Foi realizada a amplificação partindo de 1ng do DNA e o sistema PowerPlex® Fusion foi utilizado para identificação de 24 loci, dos quais 23 são loci de STR e o 24º é Amelogenina. Os produtos da

amplificação foram separados no equipamento ABI 3500 e analisados com o software GeneMapper v.5.0 (AppliedBiosystems).

4.2.6 Citogenética

A análise de estabilidade cromossômica foi realizada nas linhagens de iPSC através da técnica de bandeamento GTG. O ciclo celular foi interrompido para obtenção das metáfases em culturas com 80% de confluência, utilizando incubação com colcemid 0,1 µl/ml (ThermoFisherScientific) por duas horas. Foi realizada então a dissociação das células utilizando Accutase, seguida de centrifugação a 1500 RPM por 10 minutos. Após a retirada do sobrenadante, foi adicionada solução hipotônica de cloreto de potássio (KCl) a 0,075 M (Merck) por 30 minutos a 37°C. Em seguida, a hipotonização foi interrompida com 500 µL de fixador Carnoy 3:1 (metanol / ácido acético) e as amostras foram centrifugadas novamente. O sobrenadante foi retirado e foram adicionados 5 mL de fixador Carnoy, homogeneizando a cada 2 ml adicionados, e guardado na temperatura de -20° C por pelo menos uma hora. As amostras foram lavadas utilizando solução fixadora de Carnoy, sendo centrifugadas a 1100 RPM por 7 minutos e gotejadas nas lâminas, que foram incubadas em estufa de secagem a 57 °C overnight. Para o bandeamento GTG, as lâminas foram tratadas sequencialmente com solução de tripsina 0,2% (ThermoFisherScientific), HBSS, HBSS + SBF a 2% e HBSS, seguido de coloração com a solução de 1:5 Giemsa (Merck) em tampão fosfato. Foram analisadas 20 metáfases de cada amostra, com auxílio de microscópio e os cromossomos classificados segundo o Sistema Internacional de Nomenclatura Citogenética (SIMONS; SHAFFER; HASTINGS; 2013).

4.3 EDIÇÃO GENÉTICA PELO SISTEMACRISPR/Cas9

Para edição genética foi utilizado o protocolo descrito previamente (RAN et al., 2013). Para desenhar o RNA guia (gRNA), foi utilizada a ferramenta ChopChop (<http://chopchop.cbu.uib.no/>), buscando sequências com homologia com a região da variante gênica estudada, no exon 15 do gene SCN2A. A seguinte sequência de gRNA foi obtida e utilizada neste estudo: 5'-CCAAGTTGAAAAGCTCGGAGCTGG-3'. A sequências foram sintetizadas contendo extremidades coesivas para clonagem no plasmídeo PX459 (Addgene, Plasmídeo #62988, pSpCas9(BB)-2A-Puro V2.0). Para a clonagem, os oligos foram ressuspensos para concentração de 100µM, 1 ul de cada gRNA (top e bottom) foi adicionado a um mix contendo 6ul de água, 1µl de T4 PNK e 1µl de T4 buffer 10x, totalizando 10µl, e

essa mistura foi colocada no termociclador, sendo mantida a 37°C por 30 minutos, 95°C por 5 minutos, e resfriada de forma controlada (método *rampdown*), diminuindo 5°C por minuto, até atingir 25°C. Para os experimentos envolvendo reparo por homologia, utilizamos um *template* de 101pb para síntese de ssODN tomando por base a sequência NM_001040143, considerando o nucleotídeo mutado como região central e braços de homologia de 50pb. Nesta sequência foi introduzida a versão correta do SCN2A, bem como foi introduzida uma mutação silenciosa na sequência PAM (TTC>TTT), de modo a destruí-la, prevenindo novas clivagens pela Cas9 e introduzindo um novo códon que codifica o mesmo aminoácido, fenilalanina.

4.3.1 Digestão e ligação

A digestão do plasmídeo foi realizada utilizando 5 µg do PX459, 1µl da enzima BbSI, 5µl do buffer 2.1 NEB e quantidade de água necessária para um volume final de 50µl. A digestão foi incubada a 37 °C por 1 hora e em seguida a 65 °C por 20 minutos para inativação da enzima. Para a ligação foram utilizadas duas estratégias: a ligação de 1µl do produto da ligação, e a ligação de 6:1 na razão do cálculo: $\text{ng Vetor} \times \text{Kb inserto} / \text{Kb vetor}$. Foram adicionados ao volume do RNA guia anelado, 4µl T4 buffer, 1µl T4 ligase 1µl do vetor, e água totalizando 20 µl. A reação de ligação foi mantida na temperatura ambiente (24 °C) por 40 minutos.

4.3.2 Transformação de bactérias quimiocompetentes

Desta ligação foram utilizados 10µl para transformação de bactérias quimiocompetentes. As bactérias foram retiradas do freezer -80 °C e colocadas diretamente no gelo, o volume da ligação foi adicionado e as bactérias foram incubadas por 10 minutos no gelo. Em seguida as bactérias sofreram um choque térmico, ficando por 40 segundos a 42 °C no banho maria, e em seguida sendo colocadas de volta no gelo por 5 minutos. As bactérias foram então ressuspensas em meio LB e mantidas num agitador a 37 °C por 1 hora, e em seguida plaqueadas em LB ágar contendo ampicilina, mantidas em uma estufa a 37 °C até o dia seguinte quando foram observadas colônias na placa.

4.3.3 Colony PCR

Para confirmar a eficiência do protocolo, foi realizado um *Colony PCR*, onde 10 colônias de cada condição testada foram repicadas e colocadas em 50 µl de água, incubadas

em uma placa aquecedora a 95°C por 10 min. Foi então realizada reação de PCR utilizando 2µl deste volume utilizando os primers U6 antisense, Puromicina senso (Tabela 2) e gRNA senso.

4.3.4 Extração de DNA plasmidial

A fim de isolar os plasmídeos contendo o gRNA, novas colônias foram selecionadas, colocadas em tubos Falcon contendo LB ágar com ampicilina, e mantidas no agitador a 150 rpm a 37 °C *overnight*, e em seguida foi realizado o isolamento do DNA plasmidial por a miniPrep (QIAGEN). Os plasmídeos isolados foram sequenciados, e um deles foi selecionado para seguir com os experimentos.

4.3.5 Nucleofecção

Uma vez obtido o plasmídeo contendo o gRNA as células foram nucleofectadas. Foram utilizadas células de doador saudável para nucleofecção apenas com gRNA para indução da mutação, e células do paciente com gRNA e ultramero (SSODN) para indução da correção.

As células foram nucleofectadas utilizando o 4D-Nucleofector Core Unit (Lonza), e foram testados todas as programações sugeridas pelo fabricante para iPSC e células tronco embrionárias (programações: CA 167, CA 137, CA 150 e CB 150), utilizando a solução de nucleofecção P2. As iPSC controle, linhagem EB4 receberam 0,5µg do plasmídeo #6 contendo o gRNA e 0,5µg de um segundo plasmídeo contendo um shRNA para knockdown de P53; enquanto as células iPSC da paciente iM5 foram nucleofectadas com 0,5µg do plasmídeo #6, 0,5µg do plasmídeo contendo um inibidor da via P53 e 10µM do ssODN. Em ambos os casos foi utilizado plasmídeo contendo um inibidor da via P53 com a finalidade de evitar a morte celular que ocorria após o plaqueamento das células (antes mesmo que qualquer seleção fosse realizada).

Após a nucleofecção as células foram plaqueadas em mTeSR1 contendo inibidor da Rhoquinase, afim de evitar a morte celular. 24 horas após a nucleofecção, o meio foi substituído para mTeSR contendo puromicina (foram testadas as concentrações 0,1; 0,2; 0,3 µg/ml) e a seleção continuou até que não se observasse mais células no controle (o controle foi nucleofectado com um plasmídeo GFP sem resistência a antibiótico).

As colônias resultantes foram selecionadas, e cultivadas separadamente. Foi feito um banco de células para cada uma das colônias obtidas, e em seguida foi extraído o DNA de cada um dos clones, foi feito PCR para amplificação da região de interesse do gene SCN2A (Tabela 2), e o produto do PCR foi enviado para sequenciamento (Tabela 2).

Tabela 2. Tabela de Primers

Primer	Sequência Senso	Sequência Antissenso
SOX2	5' TTCACATGTCCC A GCACTACCAGA -3'	5'- TCACATGTGT GAGAGGGGCAGTGT GC-3'
OCT4	5'- CCCCAGGGCCC CATTTTGGTACC-3'	5'- ACCTCAGTTTG AATGCATGGGAGAGC-3'
Nanog	5'-CCTGTGATTTG TGGGCCTG-3'	5'-GACAGTCTCCGTGTGAGGCATAGC CATATGGTAGCCTCATGTCCGCTCA ATTCTGTGCCTCCGGGAGCAGGGTAGG TTCACATGTCCCAGCACTACCAGA -3'
Lin28	5'-TCACATGTGTGA GAGGGGCAGTGTGC-3'	5'-CCCCAGGGCC CCATTTTGGTACC-3'
GAPDH	5'- ACCACAGTC CATGCCATCAC-3'	5'- TCCACCACCC TGTGCTGTA-3'
AFP	5'GAATGCTGCAAA CTGACCACGCTGGAAC-3'	5'-TGGCATTCAAGA GG GTTTTCACTCTGGA-3'
MSX1	5'-CGAGAGGACCCC GTGGATGCAGAG-3'	5'-GGCGGCCATCTTC AGCTTCTCCAG-3'
TUBB3	5'-GCTCAGGGGCCT TTGGACATCTCTT-3'	5'-TTTTCACACTCCTT CCGACCACATC -3'
SCN2A PCR	5'-CTCCTTTGGG TCACTTTGATG C-3'	5'-AGGGTTTGT GTGGATTACAAT GG-3'
SCN2A Sequenciamento	5'-TGCTCTATGGT AGCAAGTCAC TGC-3'	5'-CATGGTCTCTA TCCACTCTCC-3'
U6 R	5'-GCATATACGAT ACAAGGCTG -3'	5'-AGGCGGAGCC AGTACACGA -3'
Puromicina	5'-GTTTCGCCGA CTACCCCG-3'	5'-ACACCTTGC CGAG-3'
gRNA	5'-CACCGGCTCCGAG TTTTCAAGTTGG-3'	5'-AAACCCAACTTGA AAACTCGGAGCC-3'

4.4 GERAÇÃO DE ORGANOIDES CEREBRAIS

A geração de organoides seguiu o protocolo descrito por Lancaster et al, 2014; resumidamente: foi iniciada com a etapa de formação de corpos embrióides, e após uma semana de cultivo na placa não aderente, ou após as esferas atingirem 500µm de diâmetro, as esferas foram colocadas em placas de petri não aderentes com meio de indução de neuroectoderme, consistindo de: DMEM F12, 1x Glutamax, 1x NEAA, 1x N2, 1x antibiótico (Penicilina/Streptomicina) e heparina na concentração 1µg/µL. As esferas foram mantidas nesse meio de indução por cerca de 5 dias, até que fosse possível observar a presença uma migração radial de células dando origem a um epitélio pseudo estratificado na forma de um halo de células mais claras (ou translúcidas) na borda da esfera, caracterizando a diferenciação em neuroepitélio. Essas esferas foram então transferidas para gotas de matrigelplaqueadas em parafilme, e mantidas em estufa a 37o por 30 min para polimerização do matrigel. As gotas contendo as esferas foram transferidas para uma placa de petri não aderente contendo meio de indução de diferenciação em organoide cerebral, consistindo de: 50%DMEM F12, 50% Neurobasal, insulina, 1x N2, 1x Glutamax, 1x NEAA, 1x antibiótico, 1x B-mercaptoetanol, 1x B-27 SEM vitamina A. As esferas foram mantidas nessa cultura estacionária por 4 dias, e em seguida foram transferidas para garrafas do tipo *SpinnerFlask*, com capacidade para 75mL (Corning), quando transferidas o meio foi trocado para meio de diferenciação em organoide cerebral com o detalhe da troca do B27 SEM vitamina A, por B-27 convencional. Os organoides foram mantidos em agitação contínua a 80 RPM na estufa a 37°C e 5% CO₂, e o meio foi trocado duas vezes por semana.

Para a preparação de cortes dos organoides para imunofluorescência, os organoides foram coletados, lavados com PBS, colocados em um tubo eppendorf de 1,5 µL contendo 1 µL de PFA4% gelado e incubados por 15 minutos. Depois o PFA foi retirado e os organoides lavados novamente com PBS e passados para um tubo de 1,5 µL contendo sacarose 30%, e mantidos *overnight* na geladeira a 4°C. No dia seguinte os organoides foram coletados e colocados em blocos de TissueTek, que foram congelados em um compartimento contendo isopropanol que foi submerso em nitrogênio líquido. Após a solidificação os blocos foram mantidos em um freezer a -80°C. Os cortes foram realizados em criostato, sempre na espessura de 10µm. Para as marcações as lâminas contendo os cortes foram novamente fixadas com PFA4% por 15 minutos, lavadas com PBS e seguiram o protocolo de marcação já descrito para as células. Os anticorpos utilizados estão descritos na Tabela 2.

4.5 ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA POR PCR EM TEMPO REAL

O RNA total de 1×10^6 iPSCs ou do conteúdo celular total de um organoide foi extraído utilizando Trizol® (Thermo Fisher Scientific), de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante, seguido de armazenamento das amostras a -80°C . A reação de transcrição reversa foi realizada posteriormente utilizando um kit comercial, conforme recomendações do fabricante (High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit; ThermoFisherScientific). As amplificações foram realizadas utilizando sondas Taqman comercialmente disponíveis para amplificação do gene endógeno normalizador TBP (*TATA-box binding protein*) e do gene SCN2A. O equipamento utilizado foi ABI Prism 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems). As análises foram realizadas utilizando o método delta-delta CT.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Dados paramétricos obtidos a partir das análises de PCR em tempo real foram analisados utilizando o teste t de Student e valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. As análises foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism v.7.0.

4.7 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

As células mesenquimais utilizadas neste estudo estavam disponíveis no biorrepositório do Centro de Biotecnologia e Terapia Celular do Hospital São Rafael. Tanto as células-tronco mesenquimais da paciente quanto as linhagens de iPSCs, EB4 e EA1, obtidas de doadores saudáveis do sexo masculino, foram geradas e caracterizadas previamente. Os procedimentos realizados foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital São Rafael (CAAE 19883113.0.0000.048 e CAAE 08601919.8.0000.0048).

5 RESULTADOS

5.1 GERAÇÃO DE IPSCS DE PACIENTE COM TEA E MUTAÇÃO NO GENE SCN2A

Para a reprogramação celular, foi utilizando o kit comercial Sendai 2.0 (Thermo Fisher Scientific). Entretanto numa primeira tentativa de reprogramação utilizando o protocolo estabelecido pelo kit não foram obtidas colônias de iPSC no final do processo de reprogramação. Portanto optamos por buscar novos protocolos que aumentassem a eficiência do processo. Para tanto, foram testadas condições utilizando moléculas inibidoras das vias ALK5 (SB431542), da via MEK (PD0325901), da via RHO (Tiazovivina); além de butirato de sódio (ativador da acetilação de histonas, através da inibição de HDAC) (LIN, Tongxiang et al., 2009). Foram testadas diferentes combinações desses compostos que resultaram em mudanças na eficiência do processo de reprogramação (Figura 11).

A eficiência do processo de reprogramação foi melhorada pela adição das moléculas ao protocolo de reprogramação, tendo em vista que um maior número de colônias com morfologia de célula pluripotentes foi observado nos poços que foram incubados com as moléculas. Além disso, foi possível estabelecer a melhor condição de reprogramação, representada pelo maior número de colônias e sobrevivência das células, obtida com o protocolo em que foi utilizada a MOI de 5:5:5 dos Sendai vírus contendo a construção policistrônica Klf4–Oct3/4–Sox2, cMyc, e Klf4, disponíveis comercialmente no kit Cytotune 2.0, com adição das moléculas: SB431542, PD0325901, Tiazovivina e butirato de sódio (Figura 11).

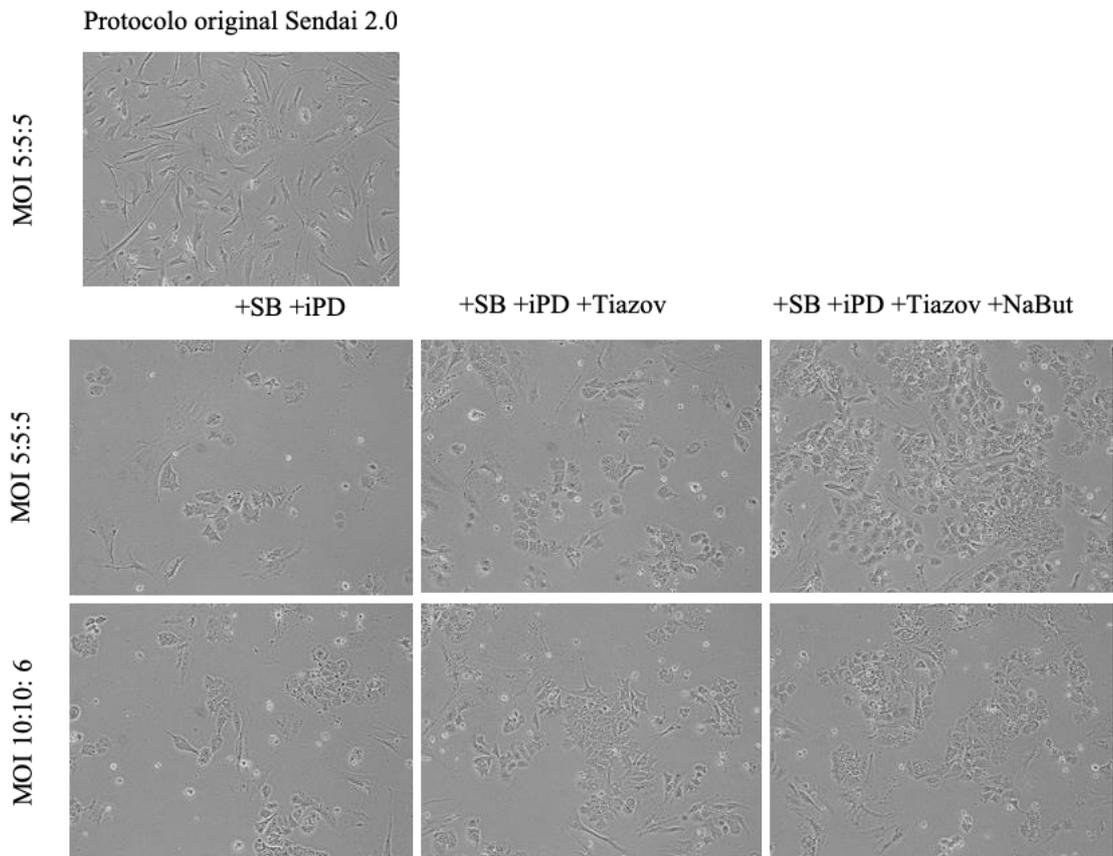


Figura 11. Reprogramação das células mesenquimais de paciente com autismo. Imagens representativas, obtidas por microscopia de contraste de fase, demonstrando as diferenças de densidade e morfologia das células reprogramadas utilizando Sendai vírus em diferentes concentrações e condições de cultivo contendo as moléculas SB, iPD, Tiazov e NaBut em diferentes combinações. Aumento = 200x.

Uma vez padronizado o protocolo de reprogramação, 10 clones foram isolados, expandidos e congelados. Destes, quatro clones foram caracterizadas por imunofluorescência para os marcadores de pluripotência Oct-4, Sox-2 e Tra1-60 (Figura 12). Além disso, a identidade genética dos clones foi confirmada por análise de STR, através da observação de equivalência dos 22 loci analisados, comparando clones de iPSCs e células somáticas de origem (Tabela 3). As subsequentes etapas de caracterização e demais experimentos foram realizados apenas com um dos clones isolados: iM5.

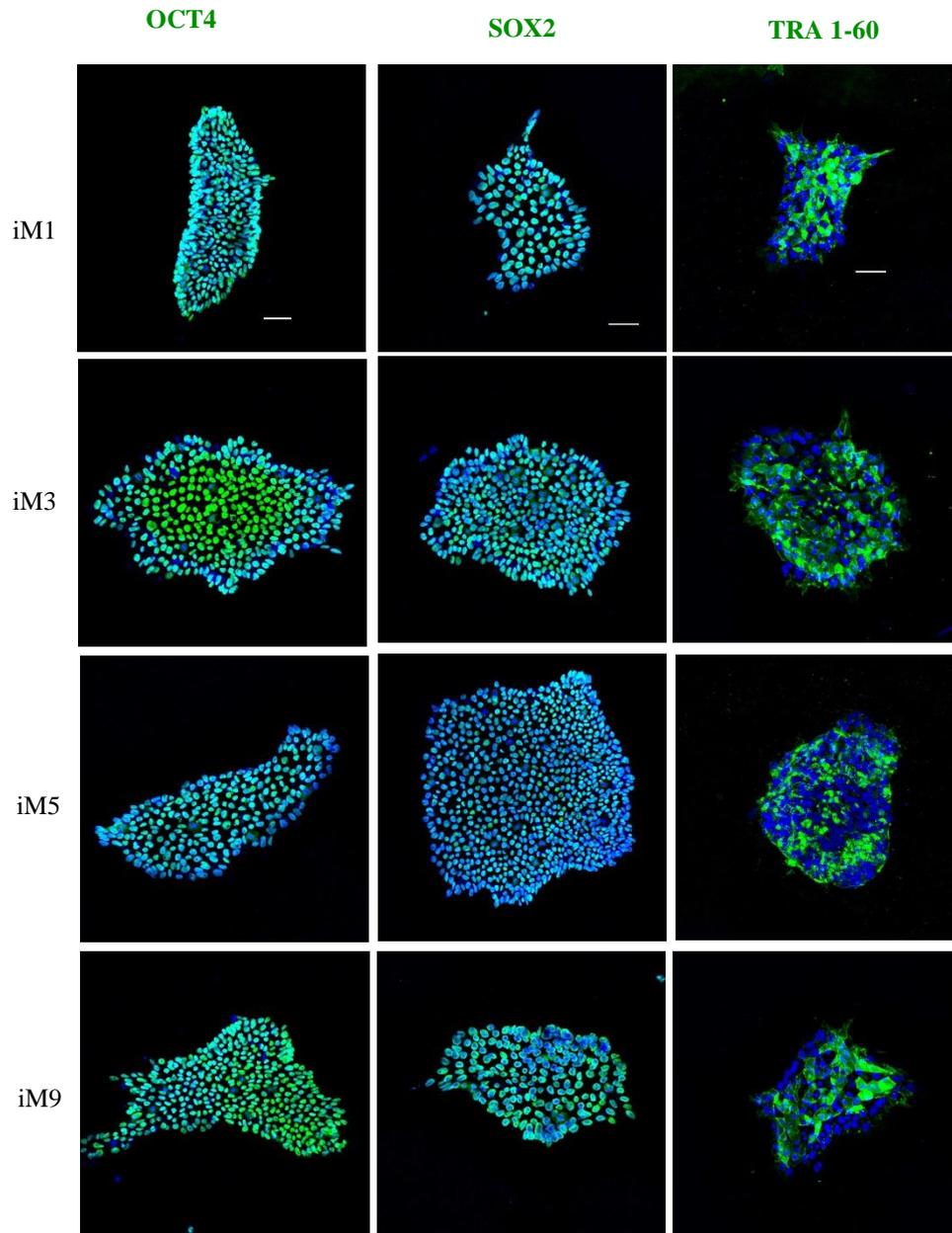


Figura 12. Expressão de marcadores de pluripotência em quatro clones de células reprogramadas. Imagens de microscopia confocal de marcadores de pluripotência OCT4, SOX2 e TRA 1-60 (verde) e núcleos corados com DAPI (azul). Barras = 50 μ m.

Locus	IM1		IM2		IM3		IM5		IM9		MOB	
AMEL	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
D3S1358	14	16	14	16	14	16	14	16	14	16	14	16
D1S1656	12	13	12	13	12	13	12	13	12	13	12	13
D2S441	11		11		11		11		11		11	
D10S1248	13	14	13	14	13	14	13	14	13	14	13	14
D13S317	11	14	11	14	11	14	11	14	11	14	11	14
PENTA E	11	12	11	12	11	12	11	12	11	12	11	12
D16S539	11	12	11	12	11	12	11	12	11	12	11	12
D18S51	18	19	18	19	18	19	18	19	18	19	18	19
D2S1338	20	23	20	23	20	23	20	23	20	23	20	23
CSF1PO	10	12	10	12	10	12	10	12	10	12	10	12
PENTA D	10	15	10	15	10	15	10	15	10	15	10	15
TH01	9.1	10	9.1	10	9.1	10	9.1	10	9.1	10	9.1	10
vWA	17		17		17		17		17		17	
D21S11	28.3	29.3	28.3	29.3	28.3	29.3	28.3	29.3	28.3	29.3	28.3	29.3
D7S820	9	11	9	11	9	11	9	11	9	11	9	11
TPOX	7.3	11	7.3	11	7.3	11	7.3	11	7.3	11	7.3	11
D8S1179	10	15.1	10	15.1	10	15.1	10	15.1	10	15.1	10	15.1
D12S391	17.1		17.1		17.1		17.1		17.1		17.1	
D19S433	13	14	13	14	13	14	13	14	13	14	13	14
FGA	22.2	23.2	22.2	23.2	22.2	23.2	22.2	23.2	22.2	23.2	22.2	23.2
D22S1045	16	17	16	17	16	17	16	17	16	17	16	17

Tabela 3. Confirmação da identidade das iPSCs a partir de análise de STR. Análise de microsatélites das colônias obtidas em comparação com a célula original MOB.

O clone iM5 apresentou morfologia típica de células pluripotentes, caracterizada pelo crescimento em colônias densas, compostas por células pequenas, com pouco citoplasma e nucléolo proeminente (Figura 13A). Foi demonstrado ainda que o clone iM5 não apresentava persistência dos transgenes inseridos na etapa de reprogramação, através do PCR para detecção de Sendai vírus (Figura 13B). Mesmo tendo eliminado os vetores e transgenes, foi possível detectar manutenção de expressão endógena dos marcadores de pluripotência OCT4, SOX2, NANOG, LIN28 e KLF4 por PCR (Figura 13B). Além disso a presença da mutação no gene SCN2A no clone iM5 foi confirmada por sequenciamento Sanger (Figure 13C). De modo a confirmar a qualidade da linhagem, foi realizada análise quantitativa da expressão dos marcadores de pluripotência de superfície Tra-1-60 e SSEA-4 por citometria de fluxo, que demonstrou positividade para os marcadores em 87% e 95% das células, respectivamente (Figura 13D). Por fim, a análise de estabilidade cromossômica, realizada pela técnica de bandeamento G, demonstrou ausência de alterações numéricas ou estruturais nas células (Figura 13E).

Em seguida, foi realizado o ensaio de formação de corpos embrióides (Figura 14A). Este ensaio permitiu comprovar a capacidade de diferenciação do clone iM5 em células dos três folhetos embrionários, que foram detectadas por imunofluorescência para os marcadores AFP (endoderme), TUBB3 (ectoderme) e alfa-SMA (mesoderme) (Figura 14B).

Dessa forma, concluímos que o clone iM5, obtido a partir das células mesenquimais da paciente portadora de transtorno do espectro autista, com mutação no gene SCN2A, se trata de fato de uma linhagem pluripotente, e essas células foram expandidas e congeladas, para utilização em experimentos posteriores.

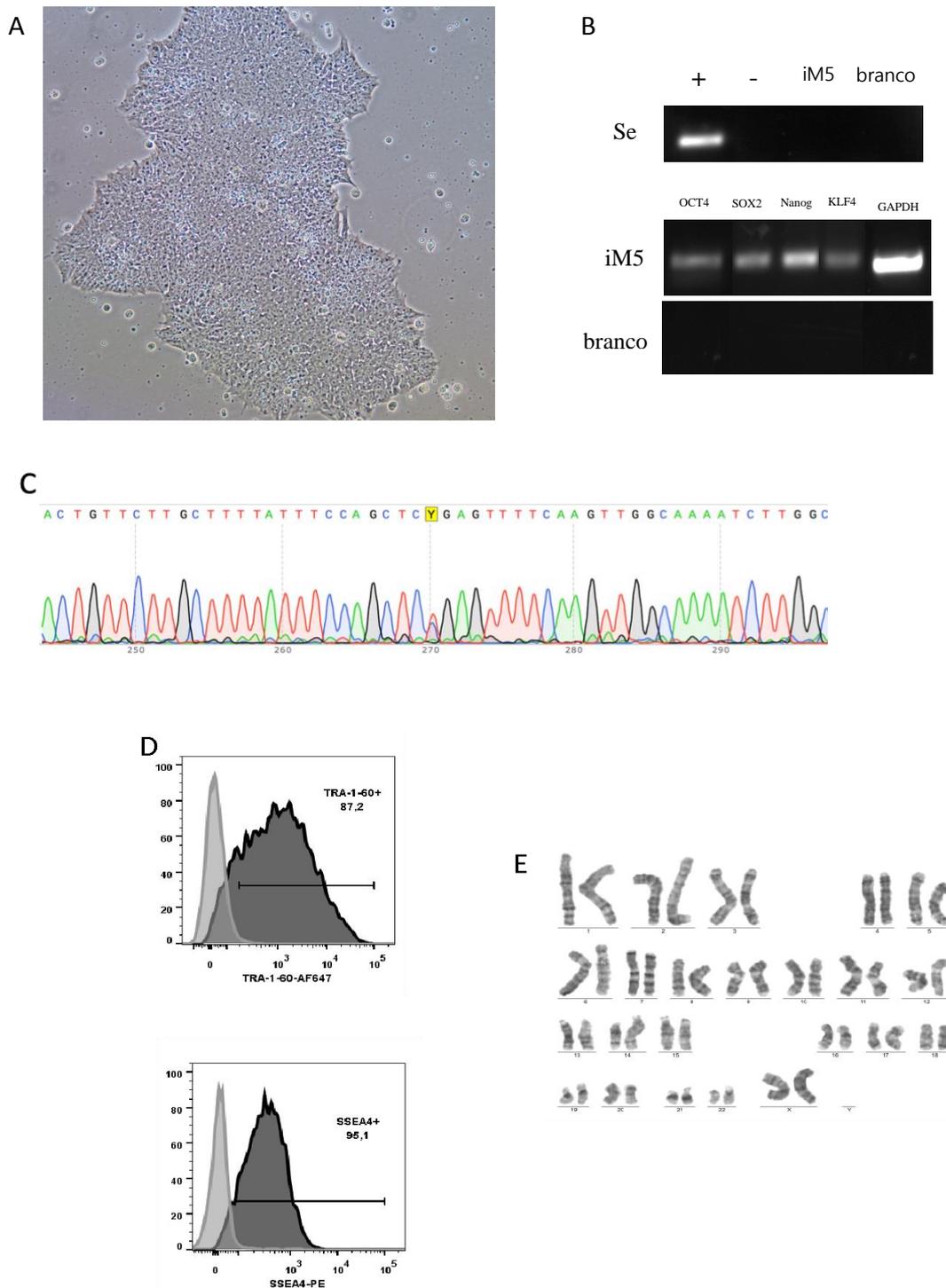


Figura 13. Caracterização do clone iM5 das células reprogramadas da paciente autista portadora da mutação no gene SCN2A. A) Imagem de contraste de fase de uma colônia de iM5 no microscópio invertido. B) Gel de agarose a 1% representando a amplificação de fragmento de Sendai vírus e de genes de pluripotência OCT4, SOX2, Nanog e controle da amostra por GAPDH, através de RT-PCR e respectivos controles. C) Sequenciamento Sanger do gene SCN2A das células iM5. D) Histogramas na análise por citometria de fluxo das células iM5 para os marcadores de pluripotência TRA-160 e SSEA4. E) Análise de cariótipo por bandeamento G dos cromossomos das células iM5.

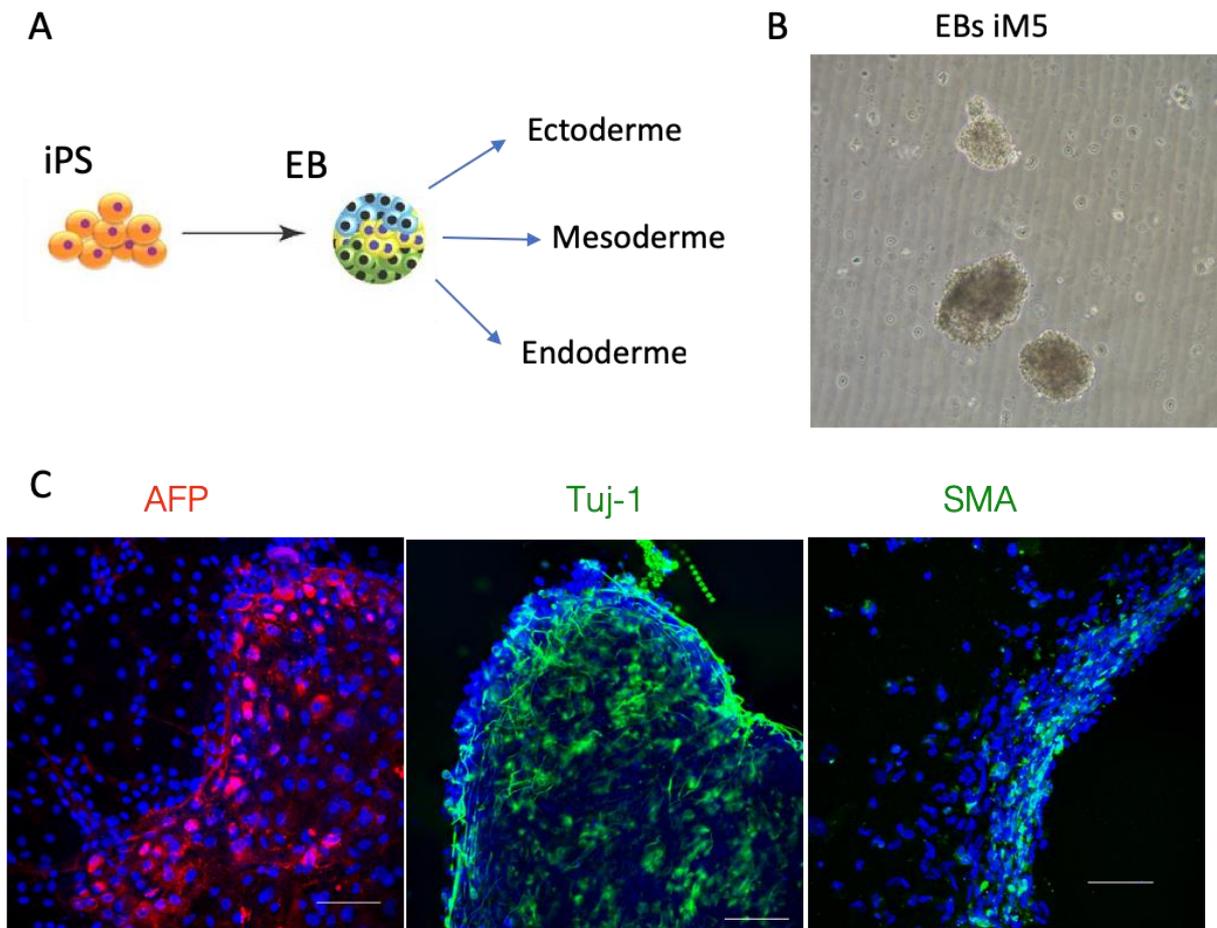


Figura 14. Ensaio de formação de corpos embrioides a partir da iPSC iM5. A) Representação esquemática do processo de formação de corpos embrioides (EBs) através da agregação das iPSCs, para diferenciação espontânea em endoderme, mesoderme e ectoderme. B) Imagem de contraste de fase por microscópio invertido dos EBs gerados a partir das células iM5. C) Análise por microscopia confocal da presença dos marcadores de mesoderme: AFP (vermelho); ectoderme: Tuj-1 (verde) e endoderme: alfa-SMA (verde) e núcleos corados com DAPI (azul), Barras = 100 μ m.

5.2 EDIÇÃO DO GENE SCN2A UTILIZANDO O SISTEMA CRISPR/Cas9

Para a indução de mutação no gene SCN2A, foi escolhida uma linhagem de iPSC de doador saudável do sexo masculino, previamente caracterizada e disponível no laboratório: EB4. Para realizar a edição genética dessas células foram desenhados gRNAs direcionados para o sítio da mutação. Foi identificada uma sequência PAM vizinha ao códon com a mutação, no caso da célula da paciente, ou no qual se deseja inserir a mutação, no caso da célula do doador saudável. Os gRNA foram então clonados em plasmídeos PX459. A ligação foi realizada utilizando duas proporções inserto/vetor, sendo que a proporção inserto/vetor 6:1 foi a mais eficiente, quando analisado o PCR das colônias de bactérias transformadas. O PCR foi realizado utilizando o primer U6 antisenso e o primer da puromicina senso, para constatar a presença do plasmídeo na bactéria, e o uso do *primer* U6 antisenso e do gRNA senso para

detectar a presença do inserto (Figura 15). Foram então extraídos os plasmídeos de 10 colônias de bactérias transformadas nessa proporção, e sequenciados. Os clones contendo o gRNA foram selecionados, expandidos e congelados, e o plasmídeo do clone #6 foi utilizado para dar continuidade aos experimentos.

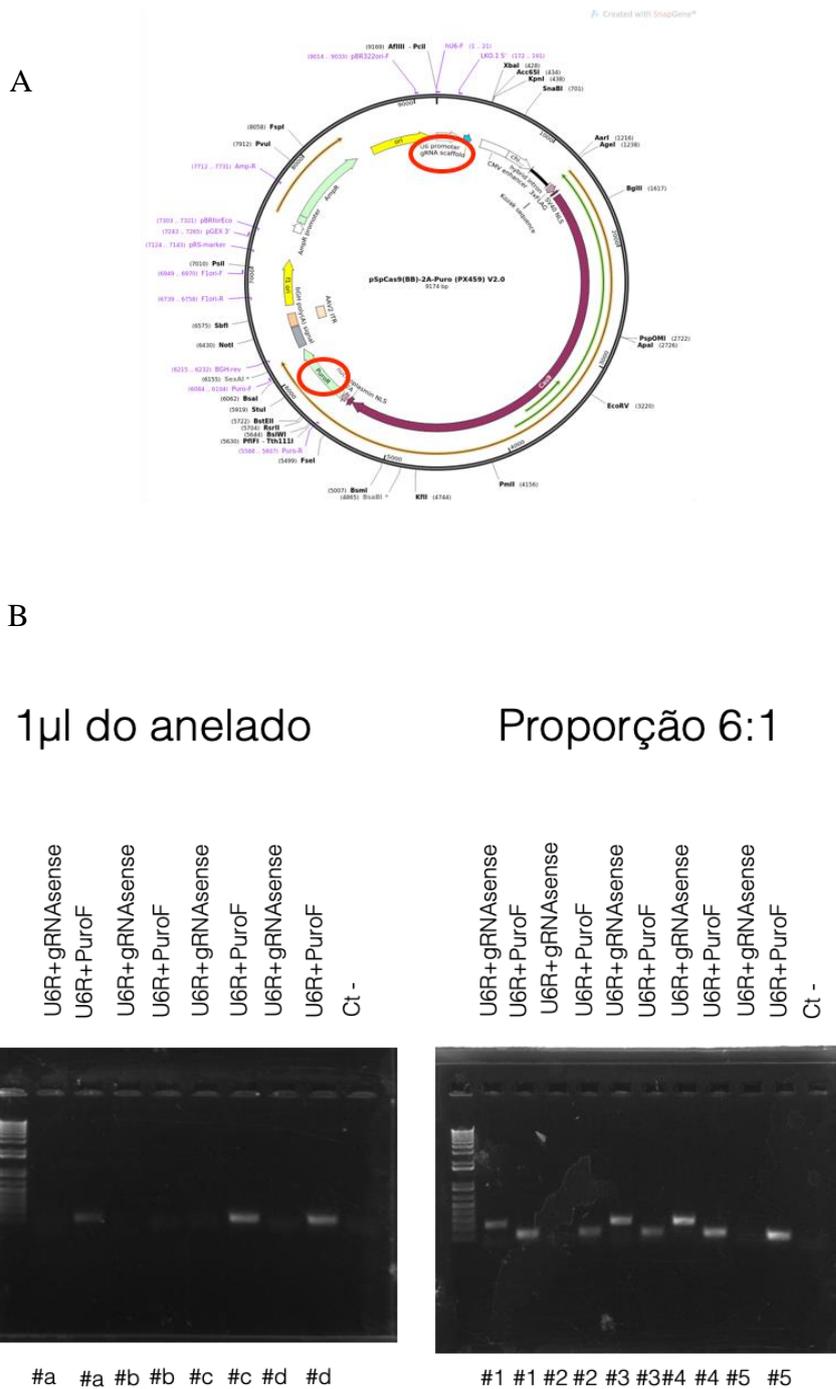


Figura 15. Clonagem do gRNA no plasmídeo PX459. A) Imagem representativa do plasmídeo utilizado. B) Confirmação da clonagem através do colony PCR, géis de agarose 1% contendo o produto das ampliações por PCR dos primers U6-R e puromicina-F, indicando a presença do plasmídeo, e U6-R e gRNAsense indicando a presença do inserto.

Para geração das células geneticamente modificadas pelo sistema Crispr/Cas9 foi utilizado o método de nucleofecção e foi necessário a realização de validações de protocolos para sua aplicação em iPSCs. O primeiro passo foi padronizar o programa de nucleofecção a ser utilizado. Foram testados todos os programas sugeridos pelo fabricante para nucleofecção de iPSC: CA167, CA137, CA150 e CB150. A eficiência da nucleofecção foi confirmada pela utilização de um plasmídeo com gene repórter GFP. A maior eficiência foi observada no programa CA167 (Figura 16A). Em seguida, foi realizada a nucleofecção das iPSCs de doador saudável, EB4, com o plasmídeo contendo gene repórter GFP. Como este plasmídeo não confere resistência à puromicina, foram também testadas diferentes concentrações deste antibiótico nas iPSC EB4 afim de estabelecer o melhor tempo e concentração a serem utilizados para eliminar as células que não são resistentes (Figura 16B). Foi constatada a melhor eficiência de seleção com Puromicina na concentração de 0,2 µg/ml após 48 horas.

Tendo estabelecido o protocolo de nucleofecção e seleção, as células da linhagem de iPSC controle saudável EB4 foram nucleofectadas com o plasmídeo #6 contendo o gRNA para indução de *knockout* do SCN2A. Oito clones de iPSCs resistentes à puromicina foram expandidos e triados por sequenciamento Sanger. Em dois destes clones, foram observados erros no sequenciamento, na região-alvo do gRNA, sugestivos de ocorrência de indels (Figura 17A). Também foi analisada a sequência de uma região de potencial *off-target* no gene SCN1A, predita pela ferramenta no momento do desenho do gRNA. Nenhuma alteração foi observada neste sítio, sugerindo a sítio-especificidade da edição genômica. Um destes clones foi selecionado para caracterização da edição gênica através da amplificação da região-alvo do SCN2A, clonagem e transformação de bactérias pela técnica de clonagem *Topo TA*. Dez clones de bactérias transformadas com o plasmídeo contendo a região-alvo do SCN2A foram isolados para sequenciamento, que demonstrou a presença de duas alterações, confirmando a ocorrência de distintas mutações em cada alelo do SCN2A neste clone de iPSC, que passou a ser identificado como EB4^{CRISPR} (Figura 17B). A primeira alteração consistente em uma deleção de 18pb, enquanto que a segunda consiste na substituição de três nucleotídeos e inserção de uma base. Entretanto, em ambos alelos, foi observada a introdução de um códon de parada prematuro, comprometendo a formação da proteína (Figura 18).

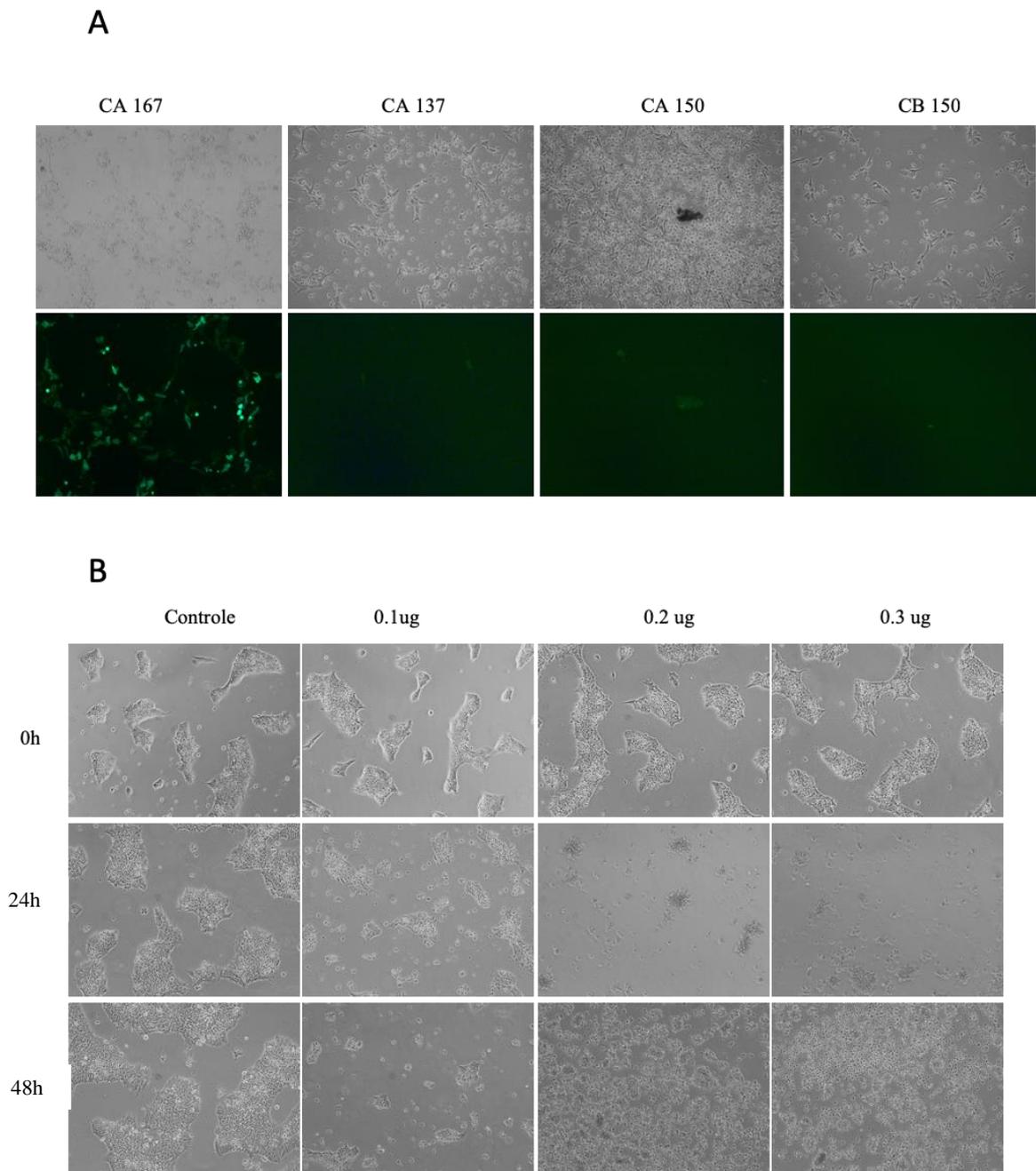


Figura 16. Padronização do protocolo de nucleofecção e seleção de clones resistentes à puromicina. A) Teste de diferentes protocolos de nucleofecção em iPSCs, linhagem EB4, utilizando um plasmídeo repórter GFP em campo claro e por fluorescência em microscópio invertido. B) Padronização do protocolo de seleção por puromicina, observando a morte celular de células nucleofectadas com plasmídeo GFP que não induzem resistência, através de microscópio invertido. Foram avaliadas três concentrações de puromicina (0,1; 0,2 e 0,3 $\mu\text{g}/\text{ml}$) após 24 e 48 horas de seleção, magnificação 200x.

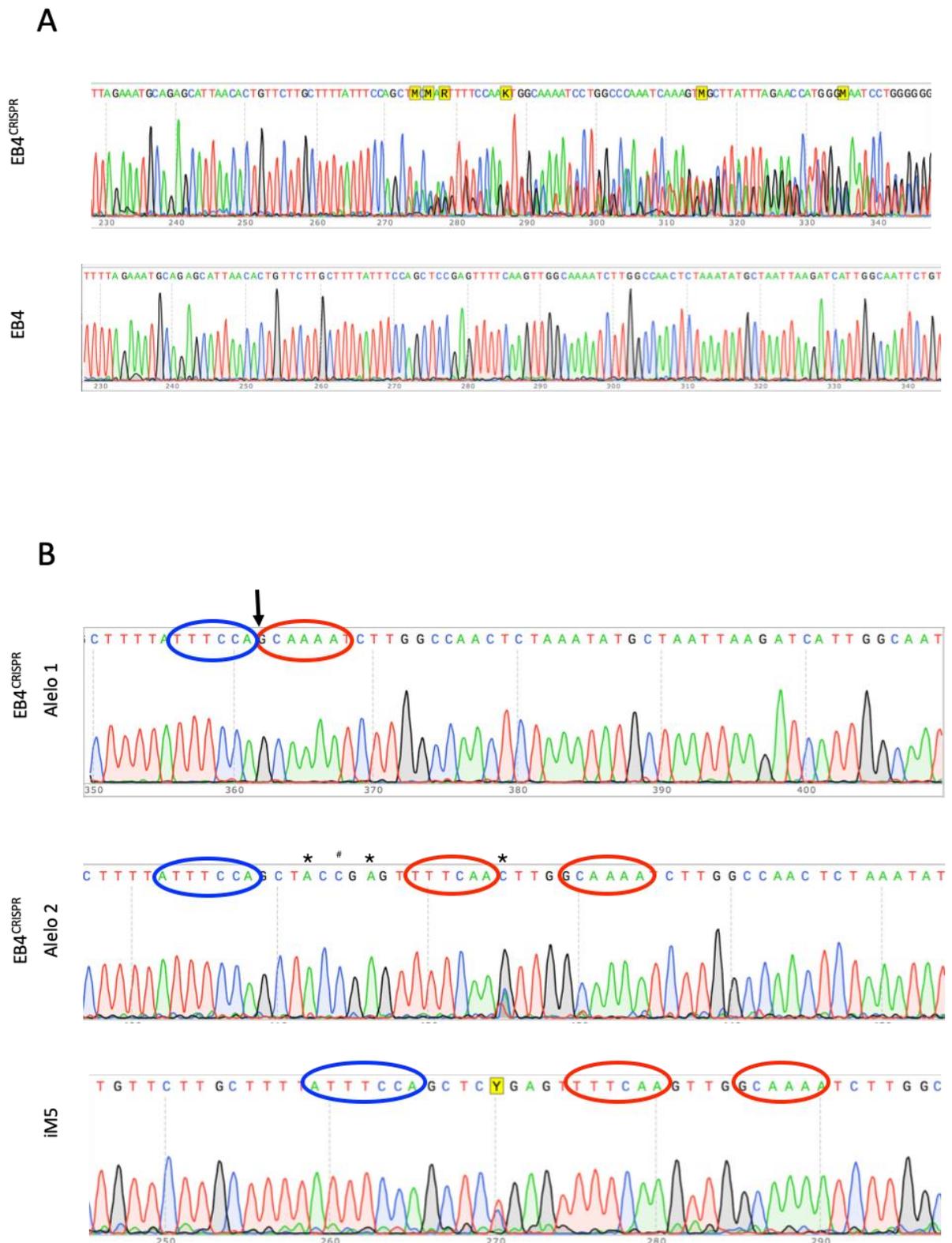


Figura 17. Dados de sequenciamento das células modificadas e controles. A) Sequenciamento Sanger do DNA genômico das células EB4^{CRISPR} e EB4 demonstrando a região-alvo do gRNA. B) Sequenciamento Sanger da clonagem TOPO realizada com cada um dos alelos da EB4^{CRISPR} em comparação com o sequenciamento do DNA da célula iM5, áreas em destaque em azul e vermelho para visualização das regiões onde ocorreram as mutações. (*) indicam mutações pontuais, troca de uma base; (#) inserção de base; (↓) área de deleção. A seta (↓) identifica deleção de 18 pb.

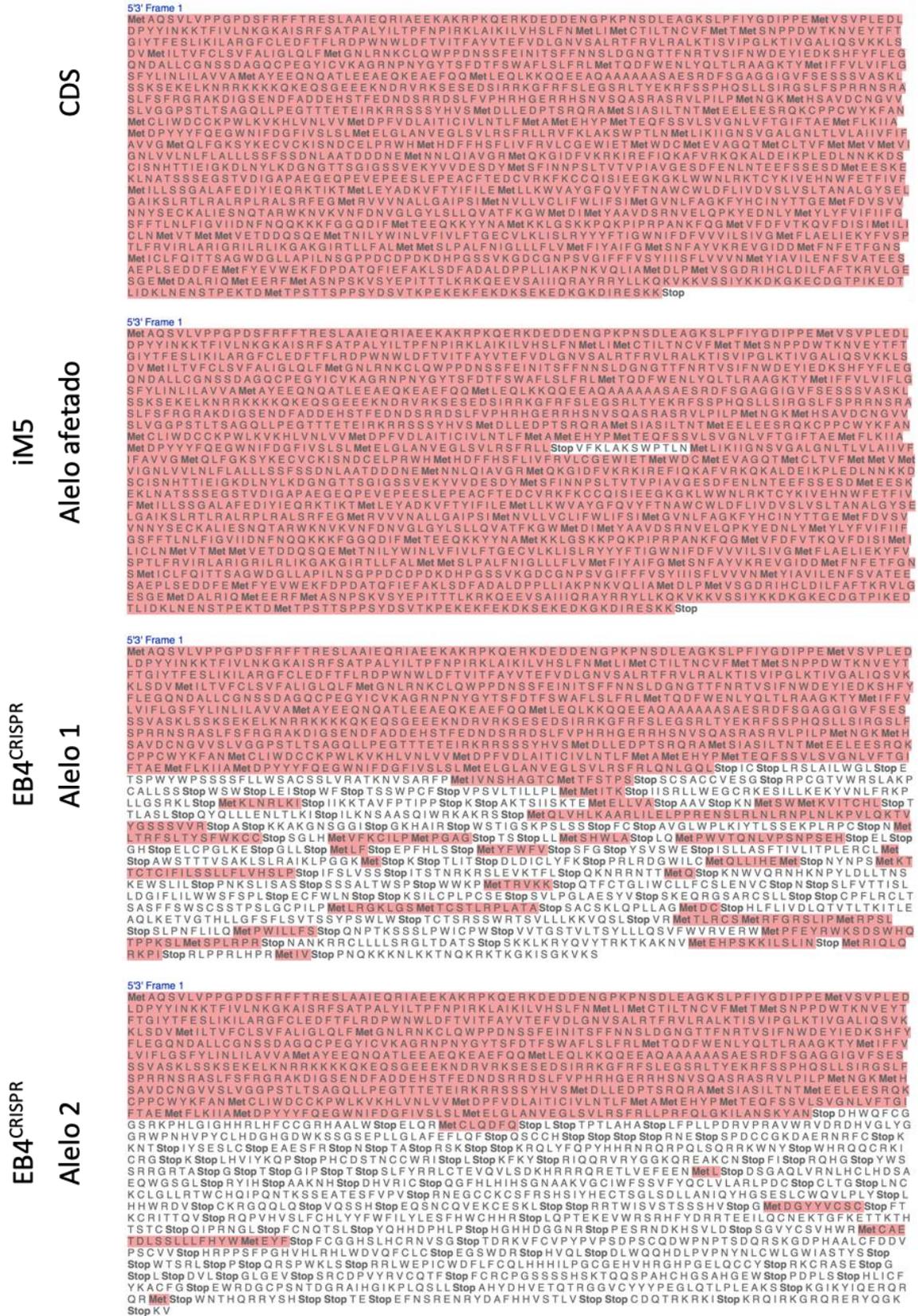


Figura 18. Predição da sequência da proteína a partir dos dados de sequenciamento do SCN2A nas diferentes linhagens de iPSC. A proteína original (CDS) em comparação com a proteína da célula da paciente com mutação pontual (inserção de um códon de parada) e com as proteínas geradas a partir de cada um dos alelos da célula EB4^{CRISPR}.

Estratégia semelhante foi utilizada para a correção da mutação presente no gene SCN2A da iPSC iM5, obtida da paciente portadora de TEA. Neste caso, no entanto, além da introdução do plasmídeo contendo o gRNA, foi também adicionada o ssODN contendo a sequência *template* para que ocorresse reparo direcionado por homologia (HDR). Foram triados por sequenciamento 10 clones de iPSC que apresentaram resistência à puromicina, tendo sido encontrados, em quatro dos clones selecionados, erros no sequenciamento sugestivos de ocorrência de edição genômica na região. Entretanto, em nenhum dos clones observou-se correção da mutação por HDR. Deste modo, as análises subsequentes foram realizadas apenas utilizando a linhagem EB4^{CRISPR}.

Para confirmar que a linhagem EB4^{CRISPR} mantinha as características de iPSC, realizamos a caracterização por imunofluorescência, citometria de fluxo, PCR e ensaios de formação de corpos embrioides. As células apresentam morfologia típica de células pluripotentes, crescendo em colônias (Figura 19A) e apresentando expressão do marcador de pluripotência Tra-1-60 em cerca de 93% das células (Figura 19B). A expressão dos genes endógenos de pluripotência foi confirmada por RT-PCR para detecção de LIN28, OCT4, SOX2 e NANOG e por imunofluorescência para Oct-4, Sox-2 e Tra-1-60 (Figuras 19C e D). Além disso, as células formaram corpos embrioides (Figura 20A) que apresentavam expressão dos genes AFP (endoderma), TUBB3 (ectoderma) e MSX1 (mesoderma), avaliada por RT-PCR (Figura 20B) e das proteínas alfafetoproteína (endoderma), Tuj1 (ectoderma) e alfa-SMA (mesoderma), avaliada por imunofluorescência (Figura 20C). Por fim, a identidade da linhagem EB4^{CRISPR} foi confirmada, através da comparação com a célula de origem, EB4, através de análise de STR (Tabela 4).

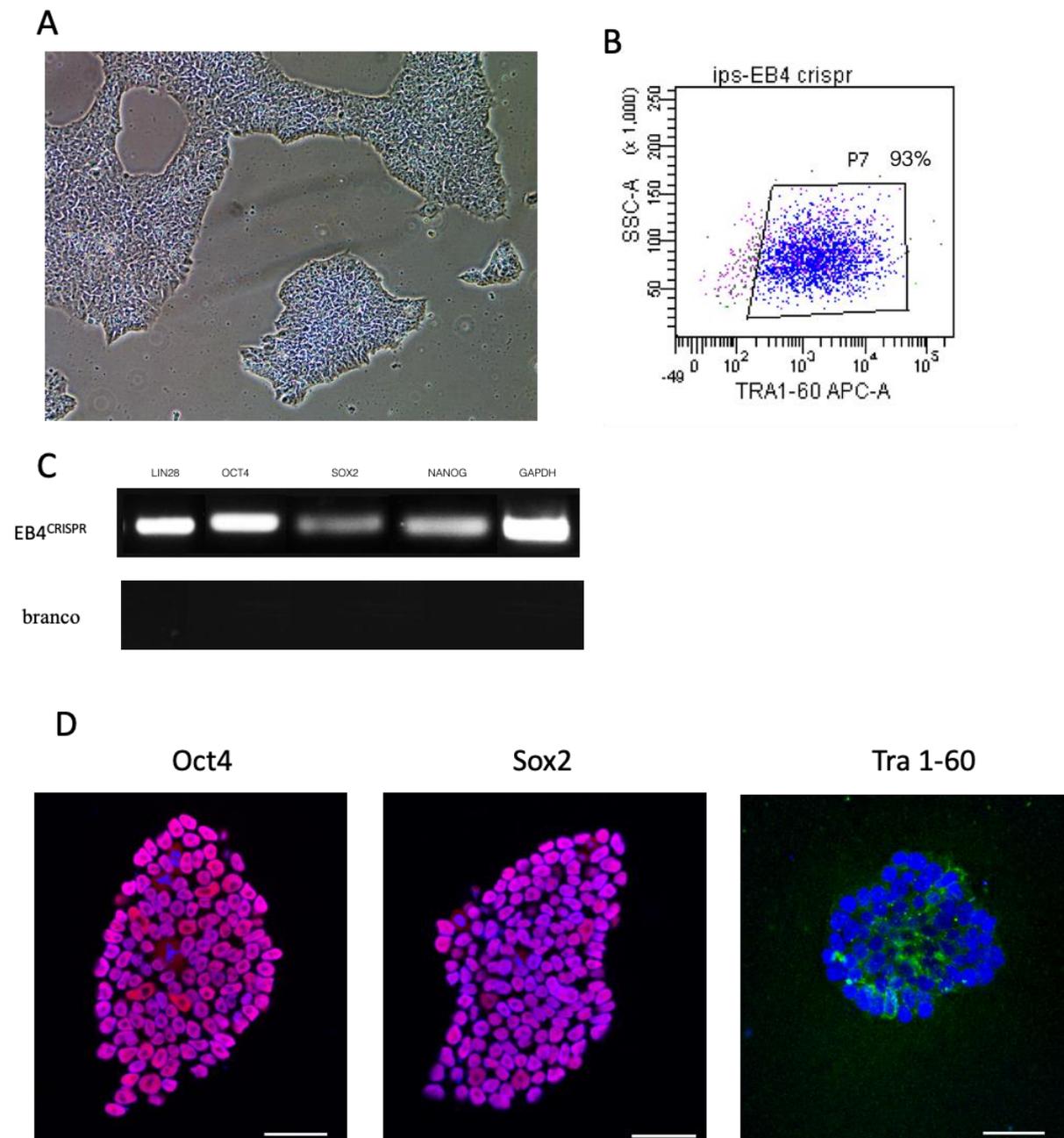


Figura 19. Expressão dos marcadores de pluripotência na linhagem EB4^{CRISPR}. A) Imagem da colônia de iPS EB4^{CRISPR} por contraste de fase em microscópio invertido. B) Gráfico dot-plot resultante da análise de citometria de fluxo do marcador de pluripotência TRA 1-60 indicando a positividade de 93% das células EB4^{CRISPR}. C) Gel de agarose 1% demonstrando a amplificação dos genes de pluripotência LIN28, OCT4, SOX2, NANOG e controle GAPDH. D) Análise por microscopia confocal de marcadores de pluripotência Oct4, Sox2 (ambos em vermelho) e Tra 1-60 (verde). Núcleos corados com DAPI (azul). Barras= 100 μ m.

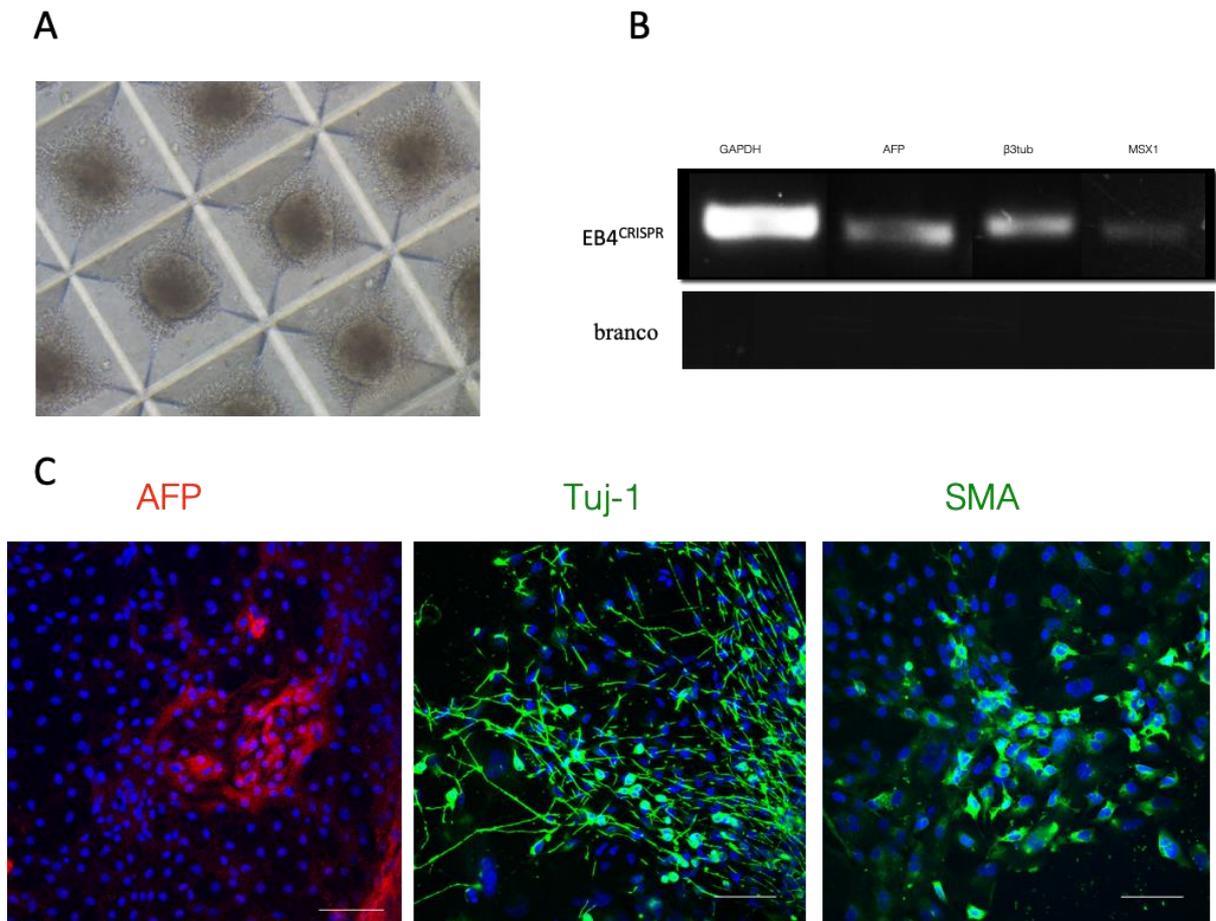


Figura 20. Ensaio de formação de corpos embrioides em células EB4^{CRISPR}. A) Aspecto dos EBs gerados a partir de EB4^{CRISPR}, imagem de contraste de fase obtida com microscópio invertido. B) Gel de agarose 1% contendo amplificação dos genes de diferenciação AFP (mesoderme:); β III tub (ectoderme) e MSX1 (endoderme). C) Análise por microscopia confocal da presença dos marcadores de mesoderme: AFP (vermelho); ectoderme: Tuj-1 (verde) e endoderme: alfa-SMA (verde) e núcleos corados com DAPI (azul). Barras = 100 μ m.

Tabela 4. Confirmação da identidade da linhagem EB4^{CRISPR} por análise de STR. Análise de microsátélites da colônia modificada obtida em comparação com a linhagem original EB4.

Locus	EB4		EB4^{CRISPR}	
	X	Y	X	Y
AMEL	X	Y	X	Y
D3S1358	16	17	16	17
D1S1656	12	14.3	12	14.3
D2S441	11	14	11	14
D10S1248	15	16	15	16
D13S317	8	12	8	12
PENTA E	5	15	5	15
D16S539	11		11	
D18S51	15	16	15	16
D2S1338	18	19	18	19
CSF1PO	11	12	11	12
PENTA D	10	13	10	13
TH01	7	8	7	8
vWA	15	18	15	18
D21S11	32.1		32.1	
D7S820	10	11	10	11
TPOX	7.3	12	7.3	12
D8S1179	13		13	
D12S391				
D19S433	13	14.1	13	14.1
FGA	20.2	22.2	20.2	22.2
D22S1045	16		16	

5.3 GERAÇÃO DE ORGANOIDES CEREBRAIS A PARTIR DE iPSCs

Foi realizada a padronização da técnica de geração de organoides cerebrais a partir de iPSCs derivadas de indivíduos saudáveis, com base no protocolo descrito na publicação original (Lancaster; Knoblich, 2014) e foram utilizadas duas linhagens de células iPSC, obtidas de doador saudável, previamente estabelecida e caracterizada no laboratório (EA1), a fim de determinar a reprodutibilidade do protocolo utilizado (Figura 21). Após serem passados para os biorreatores, última fase do processo de diferenciação, dois organoides foram removidos e fixados semanalmente para avaliação do estágio de maturação das células, utilizando os marcadores: SOX2 (neuroprogenitores), β III tub (neurônios imaturos), DCX (neurônios), FOXG1 (células do prosencéfalo) e NKX2.1 (células do prosencéfalo ventral), e da formação de estruturas internas (Figura 22).

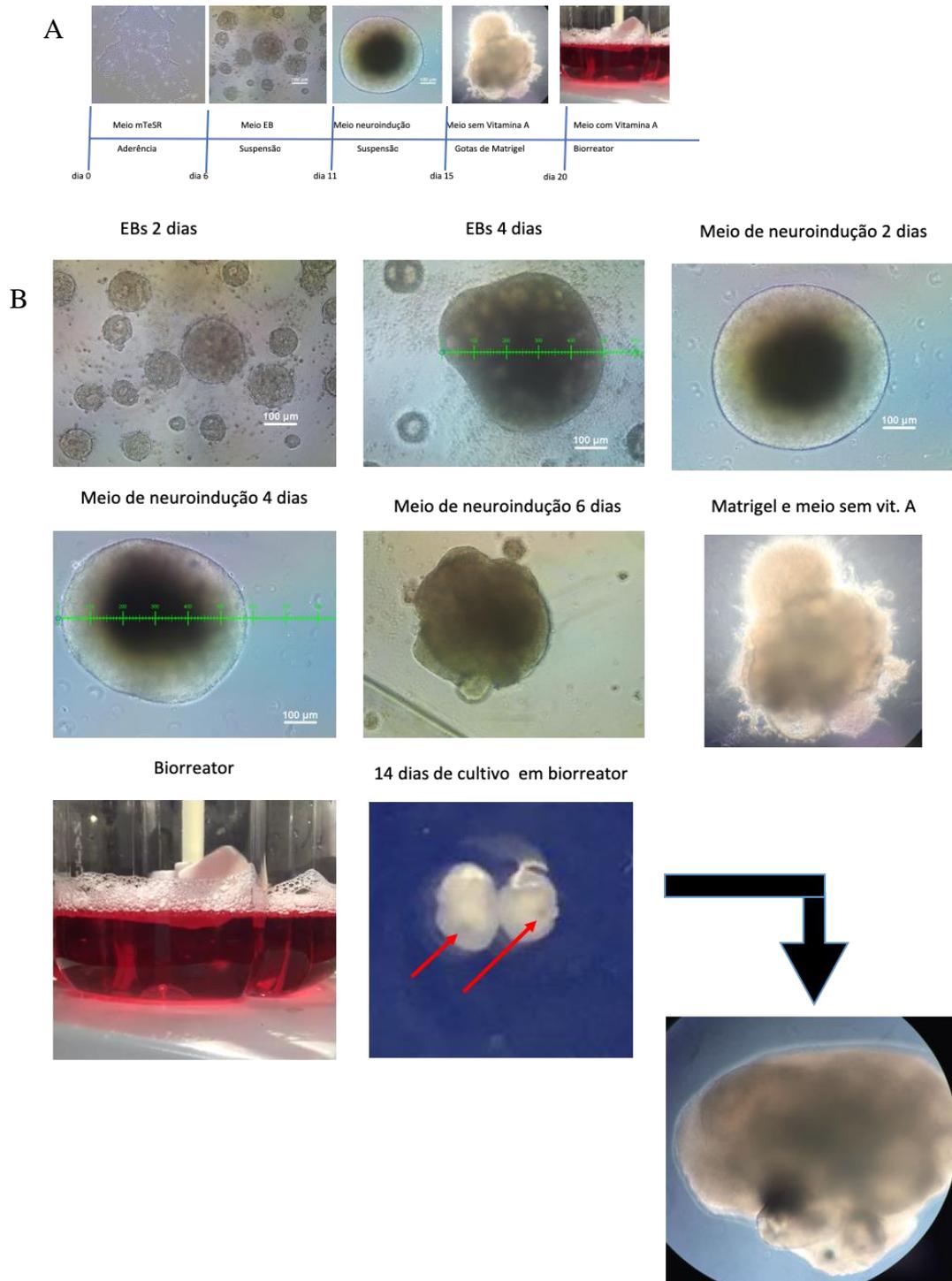


Figura 21. Geração de organoides cerebrais a partir de iPSC. A) Linha do tempo de cultivo demonstrando as fases principais do cultivo, passando pela cultura em aderência de iPSC, para a cultura em suspensão de corpos embrióides, a troca para meio de neuroindução, a passagem das esferas para gotas de matrigel e meio de organoide contendo B27 sem vitamina A, e por fim a passagem dos organoides para biorreatores de agitação magnética utilizando meio de organoide contendo B27 com vitamina A. B) Imagens de contraste de fase mostrando o tamanho e a estrutura das esferas durante cada fase do processo de diferenciação até a passagem para o biorreator. Após 14 dias de cultivo é possível observar nas imagens em destaque a presença de regiões escuras que podem ser vistas a olho nu, ou através de uma lupa simples, e correspondem à diferenciação em células pigmentadas da retina.

Foi observada a presença de neurorosetas na primeira semana (Figura 22), a presença de células Sox2⁺ mais concentradas nas regiões internas do organoide e células positivas para β III tubulina na região mais externa a partir da terceira semana (Figura 22), indicando a formação de uma zona ventricular proliferativa de células progenitoras neurais Sox2⁺ no centro do organoide, com diferenciação em neurônios que migram para a região mais externa, levando à formação da placa cortical.

Foi observada ainda uma separação de camadas com a expressão diferenciada de marcadores de maturação a partir da quinta semana (Figuras 22), quando foi possível distinguir uma camada de células SOX2 positivas em uma camada mais interna, uma camada com células duplo positivas SOX2 e β III tub e uma terceira camada com células positivas para β III tub e negativas para SOX2 (Figura 22), o que sugere a formação de uma estrutura que pode dar origem à placa cortical.

A partir da terceira semana já foi possível observar também a presença dos marcadores e DCX indicando a presença de neurônios imaturos (Figura 22).

Também foi observado, conforme previamente descrito na literatura, que as células que seguem esse protocolo de diferenciação têm uma preferência pela diferenciação em células do prosencéfalo (forebrain), indicada pela forte presença do marcador FOXG1 (Figura 22), e mais especificamente da região ventral, indicada pela presença da marcação de NKX2.1 (Figura 22).

Além disso, foi observada a presença da proteína Na_v1.2 nos organoides através de imunofluorescência (Figura 25A) e a expressão do gene SCN2a por qTR-PCR(Figura 25B).

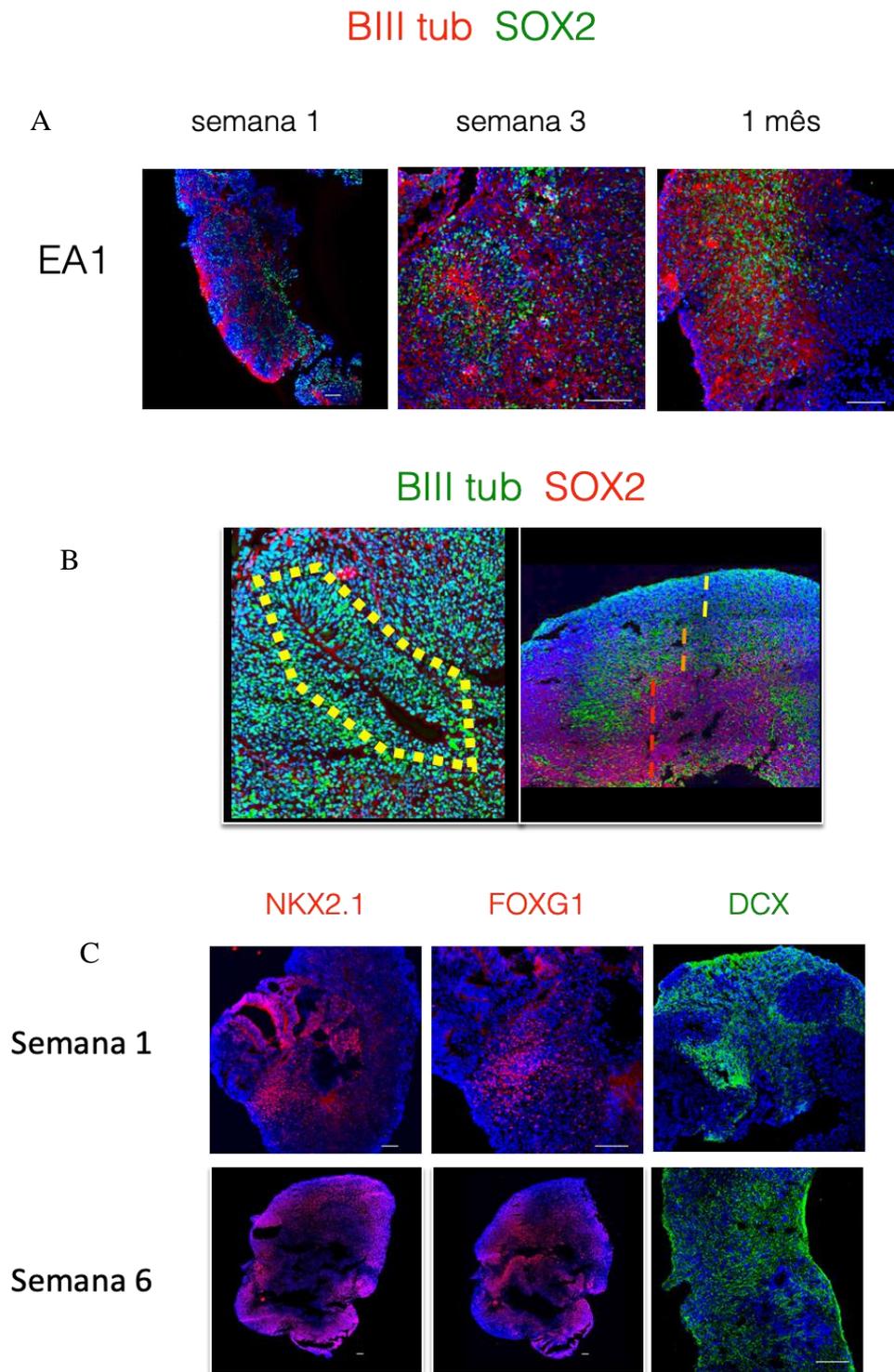


Figura 132. Caracterização por imunofluorescência dos organoides cerebrais gerados a partir das células EA1. Através da análise por microscopia confocal foi observada a expressão de marcadores de diferenciação neural e presença de estruturas definidas. A) Marcação com β III tub (vermelho) e SOX2 (verde) em organoides fixados após uma semana, três semanas e um mês de cultivo. B) Destaque para formação de estruturas, na figura da esquerda após duas semanas de cultivo a formação de neuroesetas (tracejado em amarelo), na figura da direita após seis semanas de cultivo a formação de camadas contendo células SOX2 positivas em uma camada mais interna (tracejada em vermelho), uma camada com células duplo positivas SOX2 e β III tub (tracejado em laranja) e uma

terceira camada com células positivas para β III tub e negativas para SOX2 (tracejado em rosa).C) Análise dos marcadores do prosencéfalo ventral NKX2.1 (vermelho), do prosencéfalo FOXG1 (vermelho) e de neurônios em maturação e migração Doublecortin (verde) e sua predominância após três e seis semanas de cultivo. Núcleos corados com DAPI (azul), barras de 100 μ m.

Uma vez que foi estabelecido o protocolo de diferenciação das iPSC em organoides cerebrais utilizando as células EA1, foi realizada a diferenciação das células EB4 e EB4^{CRISPR}. Observou-se que ambas as linhagens seguiram o padrão inicial de diferenciação, incluindo a formação de rosetas neurais Sox2⁺ após a primeira semana de cultivo no biorreator (Figura 23).

Entretanto nas semanas seguintes foi possível observar uma grande diferença entre o tamanho das esferas em cultivo. Enquanto os organoides derivados das iPSC EB4 eram pequenos, os organoides feitos a partir das EB4^{CRISPR} já estavam grandes desde a terceira semana. É possível observar essa diferença nas barras que indicam a escala de referência nas imagens de imunofluorescência (Figura 23). É observada ainda uma diferença no padrão da migração dessas células dentro do organoide. Enquanto nos organoides controle EB4 existe uma gradiente de migração das células mais imaturas - Sox2⁺ - na área interna, para células mais maduras - β III tub - na área externa da estrutura, nos organoides EB4^{CRISPR} são observadas rosetas nas áreas próximas às bordas do organoide, e grumos de células sem marcadores específicos ou com marcadores mais maduros na área interna (Figura 23). É possível observar, no maior aumento, que, durante as duas primeiras semanas de cultivo, ambos os organoides apresentam estrutura de rosetas semelhantes. Após um mês de cultivo, entretanto, se observa que, no organoide controle, apresenta as três camadas com células SOX2 positivas em mais interna, com células duplo positivas SOX2 e β III tub e com células positivas para β III tub e negativas para SOX2, semelhante ao padrão da linhagem EA1, enquanto no organoide EB4^{CRISPR} as células estão espalhadas, sem formação de camadas específicas (Figura 24). Se observa também que após um mês em cultivo os organoides EB4^{CRISPR} começam a sofrer uma degradação interna, e mudança na morfologia externa quando comparado até mesmo com a estrutura de organoides EB4^{CRISPR} cultivados por duas semanas (Figura 24).

Após um mês de cultivo dos organoides foi observada uma diferença na intensidade dos marcadores de diferenciação em prosencéfalo FOXG1 e NKX2.1. Enquanto a marcação para essas proteínas era forte e espalhada por todo o organoide EB4, no organoide EB4^{CRISPR} esses marcadores são fracamente expressos e se encontram em áreas restritas. Já o marcador de neurônios imaturos DCX foi expresso de forma similar pelos organoides das duas linhagens (Figura 23).

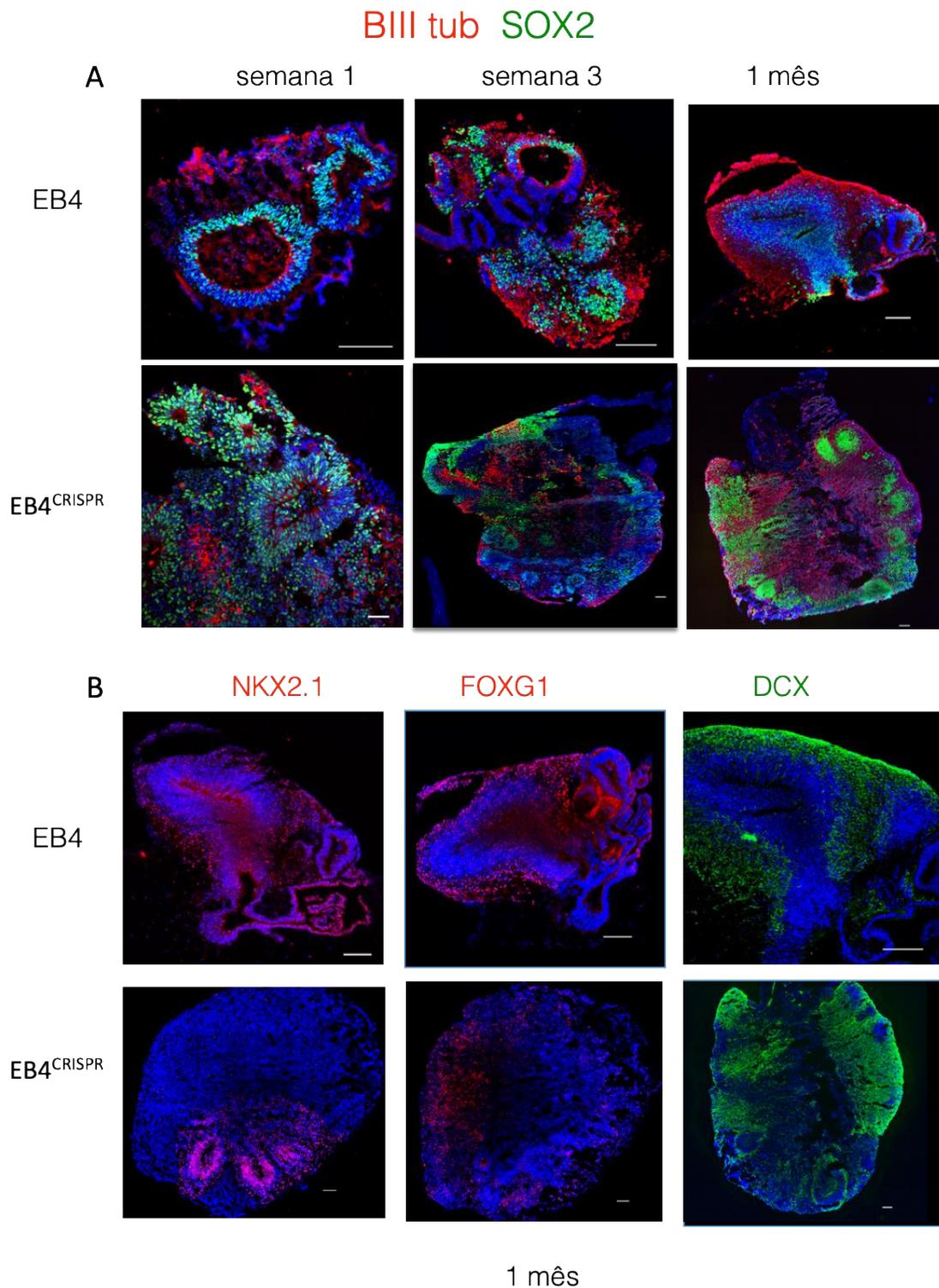


Figura 23. Caracterização por imunofluorescência dos organoides cerebrais gerados a partir das células EB4 e EB4^{CRISPR}. Análise por microscopia confocal quanto a presença de marcadores de diferenciação neural e presença de estruturas definidas. A) Marcação com βIII tub (vermelho) e SOX2 (verde) em organoides fixados após uma semana, três semanas e um mês de cultivo. B) Análise dos marcadores do prosencéfalo ventral NKX2.1 (vermelho), do prosencéfalo FOXG1 (vermelho) e de neurônios em maturação e migração Doublecortin (verde) e sua predominância após três e seis semanas de cultivo. Núcleos corados com DAPI (azul). Barras = 100μm.

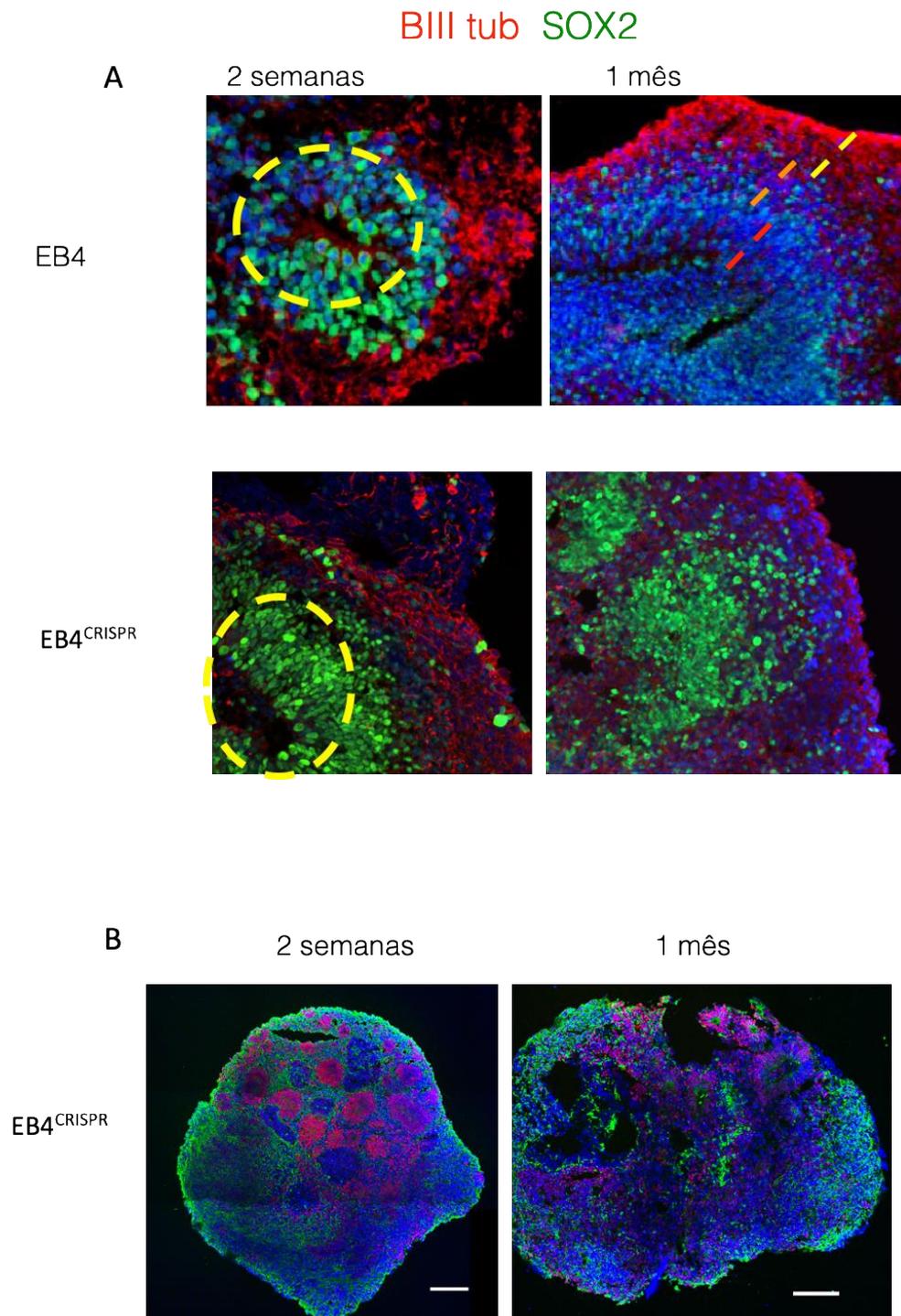


Figura 14. Análise das estruturas dos organoides gerados a partir de EB4 e EB4^{CRISPR}. A) Destaque para formação de estruturas, nas figuras da esquerda após duas semanas de cultivo a formação de rosetas (tracejado em amarelo), e na figura da direita após quatro semanas de cultivo apenas no organoide derivado de EB4 é possível observar a segregação em camadas contendo células SOX2 positivas em uma camada mais interna (tracejada em vermelho), uma camada com células duplo positivas SOX2 e βIII tub (tracejado em laranja) e uma terceira camada com células positivas para βIII tub e negativas para SOX2 (tracejado em rosa), enquanto no organóide da EB4^{CRISPR} as células se encontram difusas. B) Diferença na morfologia de um organóide EB4^{CRISPR} fixado após 2 semanas e 1 mês de cultivo no biorreator, com células progenitoras SOX2 (vermelho) e neurônios imaturos positivos para βIII tub (verde). Núcleos corados com DAPI (azul). Barras = 100μm

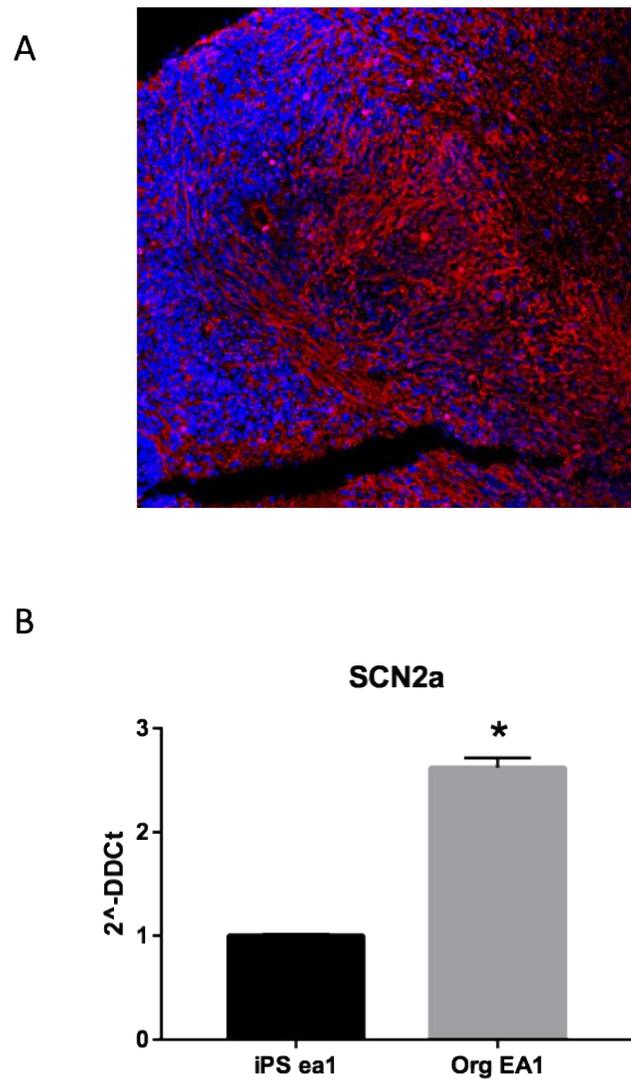


Figura 15. Expressão do SCN2A em organoides cerebrais. A) Imagem de microscopia confocal demonstrando marcação positiva para $Na_v1.2$ (vermelho) no organoide com três semanas, produzido a partir da linhagem de iPSC EA1, obtida de doador saudável. Núcleos corados com DAPI (azul). B) Avaliação da expressão do gene SCN2A por PCR em tempo real, comparando iPSCs indiferenciadas com organoides. * $p < 0,05$.

6 DISCUSSÃO

O envolvimento do gene SCN2A no desenvolvimento de TEA tem sido apontado através de fortes associações estatísticas entre a presença de mutações neste gene e o desenvolvimento da doença (YUEN et al., 2017; SANDERS et al., 2015). O SCN2A já havia sido previamente descrito como causador de outras desordens neuronais relacionadas ao neurodesenvolvimento como epilepsia e esquizofrenia, o que aumenta as chances de que haja uma associação causal entre sua mutação e outras doenças do neurodesenvolvimento, como o autismo (DILENA, et al. 2017). No presente estudo, buscamos desenvolver ferramentas que permitissem recapitular o processo de neurodesenvolvimento *in vitro*, utilizando células de pacientes afetados ou induzindo mutações no gene SCN2A em células de doadores saudáveis, com a finalidade de investigar as consequências de variantes patogênicas do gene e contribuir para a elucidação de uma possível relação causal entre essas variantes gênicas e a fisiopatologia do autismo.

Para tanto geramos uma linhagem de iPSC a partir de células somáticas de uma paciente diagnosticada com autismo e que apresentava uma mutação pontual *de novo* em um dos alelos, posição chr2:165344558, onde houve a substituição de uma citosina por timina, inserindo assim um códon de parada prematuro no meio do gene. Essa variante ainda não foi descrita na literatura, mas pode ser encontrada listada em banco de dados brasileiro (Banco de dados UNICAMP). É interessante também perceber que outras mutações no gene SCN2A, que foram descritas e catalogadas, se apresentam sempre em heterozigose, o que sugere que a homozigose para mutações nesse gene possa ser incompatível com vida.

O gene do SCN2A codifica a subunidade alfa do Na_v1.2, envolvida na formação do poro que permite a passagem de sódio pela membrana durante a ativação do neurônio para propagação do sinal elétrico (SANDERS, et al., 2018). Esse gene está expresso principalmente durante o período inicial do desenvolvimento em neurônios piramidais que migram e fazem sinapses e levam à formação do córtex cerebral (HU, Wenqin et al., 2009). Uma deficiência na atividade de canais de sódio geradas por mutações em genes que dão origem à proteínas estruturais desses canais como o SCN2A podem levar a uma despolarização precoce ou a uma ausência de capacidade de iniciar o potencial de ação, alterando os padrões de excitação da célula nervosa que desempenham papéis importantes para a sinaptogênese (WANG, KE et al., 2009).

Outras alterações também podem estar envolvidas com mutações no canal de sódio voltagem-dependentes, como o processo de migração celular (BESSON, PIERRE et al., 2015). Sinais elétricos podem funcionar como fatores que induzem a migração celular. Esse fenômeno já foi observado em células cancerosas, e são um conhecido fator de migração neuronal e neurogênese (YAO, Li et al. 2011). Desse modo, além de alterações na sinaptogênese, mutações no gene do SCN2A podem estar envolvidas com mudanças no processo de migração neuronal no período inicial do desenvolvimento, que é crítico para formação das estruturas do cérebro, e desse modo, tanto anormalidades sinápticas quanto morfológicas podem estar envolvidas no desenvolvimento do autismo associado a variantes patogênicas do SCN2A. De fato, observamos a expressão do canal nos organoides, tanto através de imunofluorescência quanto através de análise de expressão gênica, o que sugere a sua importância para as etapas iniciais do neurodesenvolvimento.

Uma limitação para o estudo de autismo é que, apesar de não ser mais considerado uma doença rara, compreende um espectro de diversas doenças e portanto existem diversas variantes que podem levar ao seu desenvolvimento, dessa forma não é comum encontrar grande quantidade de pacientes que possuam a mesma mutação no mesmo gene, por dois motivos principais: 1) em muitos casos essa mutação é gerada *de novo*, ou seja ocorre durante o processo de recombinação e divisão celular inerente a cada indivíduo e que ocorre de forma aleatória; e 2) os custos dos exames de sequenciamento do DNA ainda são altíssimos, e por isso estão restritos a uma pequena parcela da população, desse modo muitas vezes o diagnóstico clínico não é seguido de uma investigação a nível molecular, o que reduz e muito o número de pacientes candidatos a participar de algum estudo científico.

Uma forma alternativa de realizar pesquisas para essas doenças é utilizar ferramentas de edição genética que permitam gerar células com mutações semelhantes, aumentando o número de eventos analisados e permitindo que as conclusões obtidas a partir desses estudos sejam mais precisas. Além disso sistemas de edição como o de CRISPR/Cas9 permitem inserir uma correção no sítio de mutação e investigar se a recuperação da sequência normal é suficiente para restabelecer a fisiologia regular da célula ou tecido afetado. Recentemente, esta estratégia foi utilizada para indução, em iPSCs de doadores saudáveis, de variantes gênicas associadas ao autismo, incluindo uma variante no gene SCN2A. Outros autores já foram capazes de demonstrar que esta variante gerava alterações no potencial de ação das células neuronais diferenciadas (DENEULT et al., 2018).

Neste trabalho obtivemos sucesso em inserir a mutação e induzir *knockout* no gene *SCN2A* utilizando o sistema CRISPR/Cas9 em iPSCs obtidas de controle saudável, gerando assim controles isogênicos, ou seja, células derivadas de um mesmo doador com o mesmo arcabouço genético, contendo como única diferença a mutação induzida. A tentativa de geração de um controle isogênico para célula do paciente, entretanto, se mostrou mais desafiadora, pois além do corte é necessária a inserção do *template* contendo a correção. Por se tratar de uma reação onde não é possível controlar todos os fatores um grande número de amostras precisam ser triadas pois a eficiência do processo é baixa, sendo que há dados na literatura demonstrando que, dos clones que chegam a sofrer a clivagem, um pequeno número de células são de fato corrigidas pela recombinação homóloga com a sequência *template* (RAN et al., 2013). Devido a limitações técnicas, orçamentárias e de tempo, neste estudo só foi possível triar 10 dos clones obtidos após a nucleofecção. Destes, apenas quatro sofreram clivagem, e em nenhum dos casos houve recombinação homóloga com a sequência de correção. Deste modo, os experimentos foram realizados com as iPSCs do doador saudável, EB4 e EB4^{CRISPR}, linhagem em que foi obtido o *knockout* do *SCN2A*. É importante salientar que, nesta linhagem, a edição gênica ocorreu em ambos os alelos, aproximadamente na mesma região daquela existente em heterozigose nas iPSCs da paciente com autismo. A presença de alterações em ambos os alelos da linhagem EB4^{CRISPR} ajudará a potencializar os efeitos da perda da expressão do Na_v1.2 nos experimentos com organoides cerebrais.

Existem ainda muitas limitações quanto ao uso de organoides cerebrais para estudos do neurodesenvolvimento e muito se questiona sobre a reprodutibilidade entre experimentos realizados mesmo que seja realizado sobre as mesmas condições (MASON; PRICE, 2016; QUADRATO et al., 2017). De fato, é possível visualizar uma variação entre organoides em um mesmo experimento, e isso se deve ao fato de que a organização das células, uma vez que estejam agrupadas, se deve exclusivamente à sinalização interna para migração e diferenciação. Alguns fatores podem ser adicionados ao meio para favorecer a diferenciação em alguma população de interesse, mas não impede que haja variação entre os organoides, principalmente referente a morfologia. Outro fato que é crítico se refere à maturação dos organoides. Os organoides cerebrais não possuem um sistema vascular que permita a troca de gases e fluidos da massa interna das esferas. O uso de biorreatores busca suprir essa deficiência, facilitando a entrega de nutrientes para a parte interna do organoide através da cinética e velocidade. Mesmo com os biorreatores isso ainda é uma limitação. Quando as esferas estão muito grandes, o movimento não é suficiente para promover a troca de fluídos e

o aumento da velocidade leva ao cisalhamento e deterioração das estruturas. Desse modo, embora já existam relatos de organoides mantidos por até um ano, o organoide não sobrevive se atingir tamanhos muito grandes e será capaz de simular o desenvolvimento do cérebro apenas em suas etapas iniciais. Deste modo, este tipo de modelo ainda não responderá por completo que outros papéis o SCN2A desempenha em etapas posteriores da formação do sistema nervoso.

A variação das populações celulares que compõem o organoide também são uma crítica importante. Muitos grupos que trabalham com doenças da glia relataram a ineficiência do organoide em gerar células dessa população que é tão importante para o funcionamento normal do cérebro. A ausência dessas células foi relacionada ao fato de elas aparecerem numa fase um pouco mais tardia do desenvolvimento, e pela deficiência do processo de manutenção e maturação os organoides não sobreviviam o suficiente para gerar um número relevante de células como astrócitos e oligodendócitos. Para resolver esse problema duas estratégias foram desenvolvidas, a primeira consiste na adição de fatores que induzem a diferenciação de progenitores em células da glia a partir de determinado ponto da diferenciação em que o organoide "original" já foi formado (MADHAVAN et al., 2018). Uma segunda estratégia pode ser utilizada não apenas para suprir a escassez dessa população mas é válida também para várias outras populações. Nessa estratégia diversos organoides são gerados separadamente e induzidos com fatores extras a se diferenciarem em um subtipo específico ou em uma região cerebral e específica, e no final esses diversos blocos de áreas diferentes são agrupados/agregados dando origem a uma estrutura complexa denominada assembloide (BAGLEY et al., 2017). Nesse estudo utilizamos o protocolo padrão desenvolvido por Lancaster (LANCASTER, KNOBLICH, 2014), sem adição de fatores externos. Para essa investigação, os organoides foram mantidos por períodos curtos, em sistema de biorreator, e foi avaliada a presença dos marcadores de diferenciação e variação na morfologia. No entanto, as linhagens de iPSC geradas poderão ser utilizadas em estudos futuros, com eventuais refinamentos de protocolos que venham a surgir.

Nos organoides gerados nesse estudo observamos padrões de organização que foram comuns entre as três linhagens, como o aparecimento de rosetas neurais de células SOX2 positivas principalmente nas primeiras duas semanas. Nas linhagens de células saudáveis, EA1 e EB4, foi observada também a marcação para FOXG1 e NKX2.1 designando a identidade de prosencéfalo desses organoides (NÓBREGA-PEREIRA et al., 2008), já no

organoide EB4^{CRISPR} se observa uma mudança na expressão dessas proteínas, tanto na sua quantidade quanto na sua localização, em outros contextos já foi demonstrado que alterações na expressão de FOXG1 estão relacionadas a TEA (MARIANI et al., 2015). Nessas duas linhagens foi observada ainda formação de estruturas durante a maturação, com a presença de camadas específicas com regiões internas mais imaturas, um zona mista de transição, e uma camada mais externa consistindo de células mais maduras. Na linhagem editada onde a mutação do gene SCN2A gerou um *knockout*, esses padrões não foram observados. Apenas uma região do organoide foi positiva para os marcadores de prosencéfalo, e após um mês de cultivo não houve a distinção de camadas específicas dentro do organoide. O que se observou nessa linhagem modificada foi um crescimento exacerbado das esferas já na segunda semana de cultivo no biorreator. Crescimento acelerado já foi previamente observado em outros modelos de estudo do autismo causado por alterações em outros genes (VACCARINO et al., 2009; COURCHESNE et al., 2011). Nos cortes dos organoides da linhagem EB4^{CRISPR} se observa ainda que apesar de seguir o padrão de diferenciação das outras linhagens até a segunda semana, na quarta semana ocorre uma degradação grande na parte central do organoide. Além disso, as rosetas se mantêm na região mais externa do organoide, e parece haver uma maturação nas células na parte interna, em contradição com o padrão de migração observado nas células saudáveis que mantêm o centro do organoide com células mais imaturas e migração de células mais maduras para região externa. O padrão de diferenciação em neurônios, entretanto, não se altera entre as linhagens diferentes, como pode ser observado pela marcação de DCX.

No presente estudo, também demonstramos a presença de marcação para a proteína Na_v1.2 em organoides cerebrais, desde o início de sua formação, o que ainda não havia sido descrito na literatura. O relato da presença dessa proteína no início do desenvolvimento, e sua função foram estabelecidos por estudos realizados principalmente em tecidos fetais (SANDERS et al., 2018). De forma interessante foi possível observar a presença desse marcador já na terceira semana de cultivo dos organoides da linhagem EA1. A presença desse marcador no organoide reforça que é de fato uma ferramenta que possibilitará os estudos envolvendo mutações no gene SCN2A pois a proteína resultante, Na_v1.2, é expressa e pode ser quantificada quanto a seu nível de expressão nos mesmos. Nas etapas subsequentes deste trabalho, iremos analisar a expressão da proteína, padrões de formação das estruturas e da migração celular utilizando organoides das diferentes linhagens obtidas.

7 CONCLUSÃO

Neste trabalho geramos duas linhagens de iPSCs com mutações no gene *SCN2A*, através da reprogramação de células de uma paciente com autismo portadora de uma variante patogênica do gene, em heterozigose, e através da edição genética de células de iPSCs de doador saudável, da qual foi obtida uma linhagem *knockout*. Além disso, estabelecemos uma plataforma para geração de organoides que podem utilizados como ferramenta para estudo de doenças do neurodesenvolvimento, como o autismo. Demonstramos ainda pela primeira vez a presença da proteína $Na_v1.2$ nas fases iniciais de formação dos organoides cerebrais, validando esse modelo para o estudo do papel da mutação de *SCN2A* na fisiopatologia do autismo. Alterações na formação das estruturas do organoide e padrão de migração celular foram identificadas nas células *knockout* para *SCN2A*, o que sugere um papel significativo deste gene nas etapas iniciais da formação do cérebro. Estudos futuros utilizando as ferramentas geradas por esse trabalho permitirão elucidar não apenas a relação entre *SCN2A* e autismo mas também permitir o desenvolvimento de novas terapias utilizando as células para realização de testes de drogas terapêuticas que possam reduzir os sintomas e melhorar a qualidade de vida dos pacientes.

REFERÊNCIAS

- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION et al. Diagnostic and statistical manual of mental disorders (DSM-5®). **American Psychiatric Publ.**, 2013.
- AMIRI, Anahita *et al.* Transcriptome and epigenome landscape of human cortical development modeled in organoids. **Science**, v. 362, n. 6420, p. eaat6720, 2018.
- BAGAL, Sharan K. *et al.* Voltage gated sodium channels as drug discovery targets. **Channels**, v. 9, n. 6, p. 360-366, 2015.
- BAGLEY, Joshua A. *et al.* Fused cerebral organoids model interactions between brain regions. **Nature Methods**, v. 14, n. 7, p. 743, 2017.
- BEAN, Bruce P. The action potential in mammalian central neurons. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 8, n. 6, p. 451, 2007.
- BEN-SHALOM, Roy *et al.* Opposing effects on NaV1.2 function underlie differences between SCN2A variants observed in individuals with autism spectrum disorder or infantile seizures. **Biological Psychiatry**, v. 82, n. 3, p. 224-232, 2017.
- BESSON, Pierre *et al.* How do voltage-gated sodium channels enhance migration and invasiveness in cancer cells?. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1848, n. 10, p. 2493-2501, 2015.
- BETANCUR, Catalina. Etiological heterogeneity in autism spectrum disorders: more than 100 genetic and genomic disorders and still counting. **Brain Research**, v. 1380, p. 42-77, 2011.
- BHAT, Shreya *et al.* Autism: cause factors, early diagnosis and therapies. **Reviews in the Neurosciences**, v. 25, n. 6, p. 841-850, 2014.
- BUDDAY, Silvia; STEINMANN III, Paul; KUHL, Ellen. Physical biology of human brain development. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 9, p. 257, 2015.
- BUESCHER, Ariane VS *et al.* Costs of autism spectrum disorders in the United Kingdom and the United States. **JAMA Pediatrics**, v. 168, n. 8, p. 721-728, 2014.
- CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Data & Statistics on Autism Spectrum Disorder**, 2018. Disponível em: <https://www.cdc.gov/ncbddd/autism/data.html>. Acesso em: 17 dez. 2018.
- CHOI, Hwan *et al.* Modeling of Autism Using Organoid Technology. **Molecular Neurobiology**, v. 54, n. 10, p. 7789-7795, 2017.
- CHRISTENSEN, Deborah L. Prevalence and characteristics of autism spectrum disorder among children aged 8 years—autism and developmental disabilities monitoring network, 11 sites, United States, 2012. **MMWR. Surveillance Summaries**, v. 65, 2016.

COBB, Melanie M. *et al.* iPS cells in the study of PD molecular pathogenesis. **Cell and Tissue Research**, v. 373, n. 1, p. 61-77, 2018.

DENEALU, Eric *et al.* Complete disruption of Autism-Susceptibility genes by gene editing predominantly reduces functional connectivity of isogenic human neurons. **Stem Cell Reports**, v. 11, n. 5, p. 1211-1225, 2018.

DI LULLO, Elizabeth; KRIEGSTEIN, Arnold R. The use of brain organoids to investigate neural development and disease. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 18, n. 10, p. 573, 2017.

DILENA, Robertino *et al.* Efficacy of sodium channel blockers in SCN2A early infantile epileptic encephalopathy. **Brain and Development**, v. 39, n. 4, p. 345-348, 2017.

DIXON, Eryn E.; WOODWARD, Owen M. Three dimensional in vitro models answer the right questions in ADPKD cystogenesis. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, 2018.

EGLIN, R. M.; REISINE, T. Human iPS Cell-Derived Patient Tissues and 3D Cell Culture Part 1: Target Identification and Lead Optimization. **SLAS Technology**, 2472630318803277-2472630318803277, 2018.

GESCHWIND, Daniel H.; LEVITT, Pat. Autism spectrum disorders: developmental disconnection syndromes. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 17, n. 1, p. 103-111, 2007.

HU, Wenqin *et al.* Distinct contributions of Na^v 1.6 and Na^v 1.2 in action potential initiation and backpropagation. **Nature Neuroscience**, v. 12, n. 8, p. 996, 2009.

IMBRICI, Paola *et al.* Therapeutic approaches to genetic ion channelopathies and perspectives in drug discovery. **Frontiers in Pharmacology**, v. 7, p. 121, 2016.

JÄRBRINK, Krister; KNAPP, Martin. The economic impact of autism in Britain. **Autism**, v. 5, n. 1, p. 7-22, 2001.

JOHN, Chandy C.; BLACK, Maureen M.; NELSON, Charles A. Neurodevelopment: the impact of nutrition and inflammation during early to middle childhood in low-resource settings. **Pediatrics**, v. 139, n. Supplement 1, p. S59-S71, 2017.

KANNER, Leo *et al.* Autistic disturbances of affective contact. **Nervous Child**, v. 2, n. 3, p. 217-250, 1943.

KELAVA, Iva; LANCASTER, Madeline A. Dishing out mini-brains: current progress and future prospects in brain organoid research. **Developmental Biology**, v. 420, n. 2, p. 199-209, 2016.

KIMURA, Junko *et al.* Nobiletin Reduces Intracellular and Extracellular β -Amyloid in iPS Cell-Derived Alzheimer's Disease Model Neurons. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 41, n. 4, p. 451-457, 2018.

LAMB, Janine A. *et al.* Autism: recent molecular genetic advances. **Human Molecular Genetics**, v. 9, n. 6, p. 861-868, 2000.

LAMSAL, Ramesh; ZWICKER, Jennifer D. Economic evaluation of interventions for children with neurodevelopmental disorders: opportunities and challenges. **Applied Health Economics and Health Policy**, v. 15, n. 6, p. 763-772, 2017.

LANCASTER, Madeline A. *et al.* Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. **Nature**, v. 501, n. 7467, p. 373, 2013.

LANCASTER, Madeline A.; KNOBLICH, Juergen A. Generation of cerebral organoids from human pluripotent stem cells. **Nature Rotocols**, v. 9, n. 10, p. 2329, 2014.

LIN, Mingyan; LACHMAN, Herbert M.; ZHENG, Deyou. Transcriptomics analysis of iPSC-derived neurons and modeling of neuropsychiatric disorders. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 73, p. 32-42, 2016.

LIN, Tongxian *et al.* A chemical platform for improved induction of human iPSCs. **Nature Methods**, v. 6, n. 11, p. 805, 2009.

LORD, Catherine *et al.* Autism from 2 to 9 years of age. **Archives of General Psychiatry**, v. 63, n. 6, p. 694-701, 2006.

MADHAVAN, Mayuret *et al.* Induction of myelinating oligodendrocytes in human cortical spheroids. **Nature Methods**, v. 15, n. 9, p. 700, 2018.

MANDELL, D.; KNAPP, M. **Investing in our Future: The Economic Costs of Autism**. AutismSpeaks, 2012. Disponível em: <http://www.autismspeaks.org/science/science-news/autism%E2%80%99s-costs-nation-reach-137-billion-yearf>. Acesso em: 18 dez. 2018.

MANUEL, Martine N. *et al.* Regulation of cerebral cortical neurogenesis by the Pax6 transcription factor. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 9, p. 70, 2015.

MARIANI, Jessica *et al.* FOXG1-dependent dysregulation of GABA/glutamate neuron differentiation in autism spectrum disorders. **Cell**, v. 162, n. 2, p. 375-390, 2015.

MARÍN, Oscar *et al.* Patterning of the basal telencephalon and hypothalamus is essential for guidance of cortical projections. **Development**, v. 129, n. 3, p. 761-773, 2002.

MCKINNEY, Cindy E. Using induced pluripotent stem cells derived neurons to model brain diseases. **Neural Regeneration Research**, v. 12, n. 7, p. 1062, 2017.

MEMI, Fani; NTOKOU, Aglaia; PAPANGELI, Irinna. CRISPR/Cas9 gene-editing: research technologies, clinical applications and ethical considerations. In: **Seminars in Perinatology**. WB Saunders, 2018.

MULLIN, A. P. *et al.* Neurodevelopmental disorders: mechanisms and boundary definitions from genomes, interactomes and proteomes. **Translational Psychiatry**, v. 3, n. 12, p. e329, 2013.

NÓBREGA-PEREIRA, Sandrina *et al.* Postmitotic Nkx2-1 controls the migration of telencephalic interneurons by direct repression of guidance receptors. **Neuron**, v. 59, n. 5, p. 733-745, 2008.

OPENSTAX, Anatomy & Physiology OpenStax CNX, **The Nervous System and Nervous Tissue**, 2016. Disponível em: <http://cnx.org/contents/14fb4ad7-39a1-4eee-ab6e-3ef2482e3e22@8.24>. Acesso em: 18 dez. 2018.

QUADRATO, Giorgia *et al.* Cell diversity and network dynamics in photosensitive human brain organoids. **Nature**, v. 545, n. 7652, p. 48, 2017.

RAN, F. Ann V Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. **Nature Protocols**, v. 8, n. 11, p. 2281, 2013.

RAOOFIAN, Reza. Novel trends in genetics: transposable elements and their application in medicine. **Archives of Iranian Medicine**, v. 17, n. 10, p. 702, 2014.

ROBINTON, Daisy A.; DALEY, George Q. The promise of induced pluripotent stem cells in research and therapy. **Nature**, v. 481, n. 7381, p. 295, 2012.

SAHIN, Mustafa; SUR, Mriganka. Genes, circuits, and precision therapies for autism and related neurodevelopmental disorders. **Science**, v. 350, n. 6263, p. aab3897, 2015.

SANDERS, Stephan J. *et al.* Insights into autism spectrum disorder genomic architecture and biology from 71 risk loci. **Neuron**, v. 87, n. 6, p. 1215-1233, 2015.

SANDERS, Stephan J. *et al.* Progress in understanding and treating SCN2A-mediated disorders. **Trends in Neurosciences**, 2018.

SCHMUNK, Galina; GARGUS, J. Jay. Channelopathy pathogenesis in autism spectrum disorders. **Frontiers in Genetics**, v. 4, p. 222, 2013.

SHORT, Patrick J. *et al.* De novo mutations in regulatory elements in neurodevelopmental disorders. **Nature**, v. 555, n. 7698, p. 611, 2018.

SILBEREIS, John C. *et al.* The cellular and molecular landscapes of the developing human central nervous system. **Neuron**, v. 89, n. 2, p. 248-268, 2016.

SIMONS, A.; SHAFFER, L. G.; HASTINGS, R. J. Cytogenetic nomenclature: changes in the ISCN 2013 compared to the 2009 edition. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 141, n. 1, p. 1-6, 2013

SONTHEIMER, HARALD. **Diseases of the nervous system**. Academic Press, 2015. p. 319-347.

SPILLANE, J.; KULLMANN, D. M.; HANNA, M. G. Genetic neurological channelopathies: molecular genetics and clinical phenotypes. **Journal of Neurol Neurosurg Psychiatry**, v. 87, n. 1, p. 37-48, 2016.

SPRATT, Perry *et al.* The autism-associated gene Scn2a plays an essential role in synaptic stability and learning. **bioRxiv**, p. 366781, 2018.

SWAIMAN, Kenneth F. *et al.* **Swaiman's Pediatric Neurology E-Book: Principles and Practice**. Elsevier Health Sciences, p. 405-411, 2017.

TAKAHASHI, Kazutoshi *et al.*. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. **Cell**, v. 131, n. 5, p. 861-872, 2007.

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

TAVASSOLI, Teresa *et al.*. De novo SCN2A splice site mutation in a boy with Autism spectrum disorder. **BMC Medical Genetics**, v. 15, n. 1, p. 35, 2014.

TIDBALL, Andrew M. *et al.*. Rapid generation of human genetic loss-of-function iPSC lines by simultaneous reprogramming and gene editing. **Stem Cell Reports**, v. 9, n. 3, p. 725-731, 2017.

TRUJILLO, Cleber A. *et al.*. Nested oscillatory dynamics in cortical organoids model early human brain network development. **bioRxiv**, p. 358622, 2018.

TRUJILLO, Cleber A.; MUOTRI, Alysson R. Brain Organoids and the Study of Neurodevelopment. **Trends in Molecular Medicine**, 2018.

UNICAMP. **Brazilian Initiative Precision Medicine**, 2017. Disponível em: <http://bipmed.iqm.unicamp.br/view/SCN2A>. Acesso em: 15 abr. 2019

VIGONT, Vladimir *et al.*. Patient-specific iPSCs-based models of Huntington's disease as a tool to study store-operated calcium entry drug targeting. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, p. 696, 2018.

WANG, Hansen. Modeling neurological diseases with human brain organoids. **Frontiers in Synaptic Neuroscience**, v. 10, 2018.

WANG, Keet *et al.*. Critical roles of voltage-dependent sodium channels in the process of synaptogenesis during the postnatal cortical development of rats. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 29, n. 8, p. 1131, 2009.

WANG, Ping *et al.*. CRISPR/Cas9-mediated heterozygous knockout of the autism gene CHD8 and characterization of its transcriptional networks in neurodevelopment. **Molecular Autism**, v. 6, n. 1, p. 55, 2015.

WATANABE, Momoko *et al.*. Self-organized cerebral organoids with human-specific features predict effective drugs to combat Zika virus infection. **Cell Reports**, v. 21, n. 2, p. 517-532, 2017.

WEISS, L. A. *et al.*. Sodium channels SCN1A, SCN2A and SCN3A in familial autism. **Molecular Psychiatry**, v. 8, n. 2, p. 186, 2003.

WILKINSON, Royce A. *et al.*. CRISPR RNA-guided autonomous delivery of Cas9. **Nature Structural & Molecular Biology**, p. 1, 2018.

XU, Xiaohong *et al.* Reversal of phenotypic abnormalities by CRISPR/Cas9-mediated gene correction in Huntington disease patient-derived induced pluripotent stem cells. **Stem Cell Reports**, v. 8, n. 3, p. 619-633, 2017.

YADAV, Ruchi; SRIVASTAVA, Prachi. Clustering, Pathway Enrichment, and Protein-Protein Interaction Analysis of Gene Expression in Neurodevelopmental Disorders. **Advances in Pharmacological Sciences**, v. 2018, 2018.

YAO, Li *et al.* Electric field-guided neuron migration: a novel approach in neurogenesis. **Tissue Engineering Part B: Reviews**, v. 17, n. 3, p. 143-153, 2011.

YUEN, Ryan KC *et al.* Whole genome sequencing resource identifies 18 new candidate genes for autism spectrum disorder. **Nature Neuroscience**, v. 20, n. 4, p. 602, 2017.

ZOGHBI, Huda Y. Postnatal neurodevelopmental disorders: meeting at the synapse? **Science**, v. 302, n. 5646, p. 826-830, 2003.