



CURSO DE MEDICINA

MOISÉS SANTANA OLIVEIRA

**TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA: UM ENSAIO *IN VITRO* DA
FISIOPATOLOGIA RELACIONADA AOS GENES *SCN2A* E *RELN*.**

Salvador

2021

Moisés Santana Oliveira

**TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA: UM ENSAIO *IN VITRO* DA
FISIOPATOLOGIA RELACIONADA AOS GENES *SCN2A* E *RELN*.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública
para aprovação parcial no 4º ano de Medicina.

Orientador: Prof. Dr. Bruno Solano de Freitas
Souza.

Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª. Milena Pereira
Pondé.

Salvador

2021

TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA: UM ENSAIO *IN VITRO* DA FISIOPATOLOGIA RELACIONADA AOS GENES *SCN2A* E *RELN*.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública para aprovação parcial no 4º ano de Medicina.

Orientador: Prof. Dr. Bruno Solano de Freitas Souza.

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Milena Pereira Pondé.

Data de aprovação: _____/_____/_____.

BANCA EXAMINADORA

Nome / Titulação/ Instituição

Nome / Titulação/ Instituição

Nome / Titulação/ Instituição

FONTES DE FINANCIAMENTO

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia - Brasil (FAPESB).

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a meus pais, Antônio e Tânia, que sempre me incentivaram em todos os aspectos da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Tenho uma lista enorme de pessoas a quem devo muito e que me fizeram persistir na jornada acadêmica, certamente nunca conseguirei “pagar” por esses incentivos. Porém, gostaria primeiramente de agradecer a Deus por sempre me guiar para os melhores caminhos.

Ainda em primeiro lugar, gostaria de agradecer aos meus pais, Antônio e Tânia por serem meu porto seguro e sempre estarem comigo em todos os momentos, eu amo vocês! À toda a minha família, em especial meus tios(as) Suely, Célia, Celma, Liu, Lunalva, Dazil, Orlando e Cau e a todos os meus primos por me incentivarem a seguir em frente e me alegrar nos momentos mais difíceis.

A meu orientador, Dr. Bruno Solano, a quem tive o prazer de trabalhar junto por alguns anos, gostaria, além de agradecer, dizer que o senhor é um exemplo de pesquisador e a quem eu sempre verei como meta. Orgulho-me de falar que fui orientado pelo senhor, muito obrigado. A todos os meus colegas do CBTC, em especial Gabriele, Gabriela, Nobru, Roque, Erik, Luciana, Dandara e Bruno Cavalcanti gostaria de agradecer pela paciência para tirar minhas dezenas de dúvidas e por me estimularem a procurar mais e mais o mundo das células tronco.

A meus amigos do colégio Eduarda, Sarah, Rainara e Ana e aos da faculdade, em especial, Alexandre, Gustavo, Larrie, Luiza, Samantha, Victória e Diego meu MUITO obrigado por serem a alegria em momentos de angústia e o relaxamento em tempos de estresse.

Por fim, gostaria de agradecer a todos que, de alguma forma, contribuíram para esse trabalho, mesmo que indiretamente, aos meus professores do ensino médio, em particular Branca e Marconi, obrigado por me fazerem cientista desde cedo. Aos meus professores da faculdade, a minha coorientadora Dra. Milena Pondé e a minha professora de metodologia Dra. Alessandra Caldas: muitíssimo obrigado.

Saudações!

EPÍGRAFE

Uma flor nasceu na rua!
Passem de longe, bondes, ônibus, rio de aço do tráfego.
Uma flor ainda desbotada
ilude a polícia, rompe o asfalto.
Façam completo silêncio, paralisem os negócios,
garanto que uma flor nasceu.

A flor e a náusea - Carlos Drummond de Andrade (1945)

[Que este projeto seja a primeira “flor” científica de todo um jardim que pretendo semear no futuro].

RESUMO

OLIVEIRA, M. S. **Transtorno do espectro autista: um ensaio *in vitro* da fisiopatologia relacionada aos genes *SCN2A* e *RELN***. 2021. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Medicina) – Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, Salvador, 2021. [Orientador: Prof. Dr. Bruno Solano de Freitas Souza].

INTRODUÇÃO: A incidência do Transtorno do Espectro Autista (TEA) está crescendo, mas a sua fisiopatologia e etiologia ainda são incertas. Esse distúrbio é causado por fatores genéticos e ambientais, sendo os genes *SCN2A* e *RELN* os mais proeminentes associados ao TEA. Assim, este estudo tem como objetivo investigar o papel dos genes *SCN2A* e *RELN* na expressão do fenótipo autista. **METODOLOGIA:** Células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs) previamente produzidas de doadores saudáveis (EA1, EB4), *knockout* para o gene *SCN2A* (EB4CRISPR) e advindas de um paciente autista com mutação nesse mesmo gene (iM5) foram diferenciadas em organoides cerebrais, em células tronco neuronais (NSC) e em neuroesferas. Após a maturação, análises de imunofluorescência foram realizadas. Para o ensaio estatístico foi utilizado o teste One-way ANOVA com o pós-teste Tukey para múltiplas comparações. **RESULTADOS:** os corpos embrióides de iM5 não desenvolveram organoides cerebrais, em contraste com EB4 e EA1. Todas as NSC foram validados por Q-PCR, indicando maior diferenciação de iM5. As neuroesferas iM5 tinham morfologia atípica e extensões neuronais menores quando comparadas com outras na imunofluorescência. Além disso, o clone *knockout* continuou migrando e crescendo mais do que o iM5 - esse último também tinha outras mutações, como no gene *RELN*. Por fim, iM5 cultivado com meio condicionado (50% de meio basal de neuroesferas e 50% de meio coletado de outras neuroesferas) do clone *knockout* apresentou melhor crescimento e migração, em comparação com culturas de iM5 em meio basal ou mesmo com iM5 em meio condicionado de iM5. **CONCLUSÃO:** A migração normal do clone *knockout*, quando comparado com o clone iM5, indica que o gene *SCN2A* não tem um papel principal na migração neuronal e leva à hipótese de que o gene *RELN* está relacionado à migração e crescimento neuronal. Mais experimentos são necessários para confirmar esses resultados.

Palavras-chave: Transtorno do Espectro do Autista; *SCN2A*; *RELN*; iPSC; Neuroesferas.

ABSTRACT

Oliveira M. S. Autism spectrum disorder: an *in vitro* assay of pathophysiology related to *SCN2A* and *RELN* genes. 2021.

BACKGROUND: The incidence of autistic spectrum disorder (ASD) is growing, but the pathophysiology and the etiology is still uncertain. This disorder is caused by genetic and environmental factors causality, with the *SCN2A* and *RELN* genes being the most prominent associated to ASD. Hence, this study aims to investigate the role of *SCN2A* and *RELN* genes at ASD phenotype expression. **METHODS:** Previously produced induced pluripotent stem cells (iPS) lineages from healthy donors (EA1, EB4), *SCN2A* gene knockout (EB4CRISPR) and autistic patient with this mutation (iM5) proceed to cerebral organoids, neuronal stem cells (NSC) and neurospheres generation. Following maturation, their immunofluorescence analysis was performed. For statistical assay were used One-way ANOVA test with Tukey's post-test for multiple comparisons. **RESULTS:** iM5 embryoid bodies didn't develop cerebral organoids, in contrast to EB4 and EA1. All NSCs were cell-type validated with Q-PCR, indicating higher iM5 differentiation. iM5 neurospheres had atypical morphology and smaller neuronal extensions when compared with others at immunofluorescence. Also, knockout clone kept migrating and growing more than iM5 one – this clone also had a mutation at genes like *RELN*. At last, iM5 cultivated with conditioned medium (50% neurospheres basal medium and 50% medium collected from other neurospheres) from knockout clone showed better growing and migration, compared with healthy cells conditioned or basal mediums iM5 cultures. **CONCLUSION:** Normal migration of knockout clone when compared with impaired one from iM5, improved with conditioned medium, indicates that *SCN2A* doesn't have a main role at neuronal migration and leads to hypothesis that *RELN* is related to neuronal migration and growth. More experiments are needed to confirm these results.

Keywords: Autism Spectrum Disorder; *SCN2A*; *RELN*; iPS; Neurospheres.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Prevalência do autismo nos Estados Unidos em diferentes cortes temporais.....	15
Figura 2 – Genes relacionados ao transtorno do espectro autista.....	18
Figura 3 – Alterações no potencial de membrana dos neurônios.....	19
Figura 4 – Modelo das fases de migração neuronal durante o desenvolvimento.....	21
Figura 5 – Esquema mostrando alguns dos usos para as iPSCs.....	23
Figura 6 – Linha do tempo comparativa entre o desenvolvimento cerebral humano e o desenvolvimento de organoides.....	24
Figura 7 – Fluxo de cultura de células iPSCs.....	27
Figura 8 – Fluxo de geração de organoides cerebrais.....	29
Figura 9 – Fluxo de cultura de células NSC.....	31
Figura 10 – Fluxo de geração de neuroesferas.....	33
Figura 11 – Fluxo de análise por imunofluorescência das neuroesferas.....	34
Figura 12 – Imagens de campo claro das células iPSCs EB4 após descongelamento.....	35
Figura 13 – Imagem de campo claro dos corpos embrioides (EBs) no dia 7 do protocolo, na placa de 96 com fundo em U não aderente.....	36
Figura 14 – Caracterização por imunofluorescência dos organoides cerebrais gerados a partir das células EA1.....	37
Figura 15 – Imagens de campo claro das células NSC EB4.....	39
Figura 16 – Imagem de campo claro das neuroesferas no dia 21 do protocolo.....	39
Figura 17 – Análise por imunofluorescência das neuroesferas.....	40
Gráfico 1 - Análise das NSC pela PCR <i>real time</i>	38
Gráfico 2 - Migração dos núcleos das neuroesferas pelo poço.....	41
Gráfico 3 - Razão entre a área do núcleo e área do axônio da neuroesfera iM5 com diferentes meios condicionados.....	42
Gráfico 4 - Migração dos núcleos da neuroesfera iM5 pelo poço com diferentes meios condicionados.....	43

LISTA DE ABREVIATURAS

TEA	Transtorno do Espectro Autista
DMS-5	Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais
iPSCs	Células Tronco Pluripotentes Induzidas pelo Homem
NSC	Células Tronco Neuronalis
EB	Corpos Embrioides
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
e.g.	<i>Exempli gratia</i> , por exemplo
i.e.	<i>Id est</i> , isto é

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
2 OBJETIVOS.....	13
2.1 Objetivo Primário.....	13
2.2 Objetivos Secundários	13
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	14
3.1 Autismo.....	14
3.2 <i>SCN2A</i>	18
3.3 <i>RELN</i>	20
3.4 iPSCs.....	22
3.5 Organoides cerebrais.....	23
3.6 Neuroesferas.....	25
4 METODOLOGIA.....	26
4.1 População do estudo.....	26
4.2 Considerações éticas e aspectos organizacionais.....	26
4.3 Geração e caracterização das iPSCs.....	26
4.4 Cultura de iPSCs.....	26
4.5 Geração de organoides cerebrais.....	27
4.6 Imunofluorescência dos organoides cerebrais.....	29
4.7 Geração das NSC.....	30
4.8 Cultura das NSC.....	30
4.9 PCR real time das NSC.....	31
4.10 Formação das neuroesferas.....	32
4.11 Análise da migração neuronal.....	33
4.12 Análise estatística.....	34
5 RESULTADOS.....	35
6 DISCUSSÃO.....	44
7 CONCLUSÕES.....	48
REFERÊNCIAS.....	49
APÊNDICES.....	55

1 INTRODUÇÃO

O autismo foi primeiramente abordado como uma síndrome psiquiátrica por Leo Kanner em 1943, expresso como um distúrbio no contato afetivo¹. Atualmente ele engloba diversas desordens, sendo chamado de Transtorno do Aspecto Autista (TEA), e utilizando-se para diagnóstico o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-5), que aborda o autismo como um “déficit persistente na comunicação social e na interação social” associado a ocorrência de “padrões restritos e repetitivos de comportamento, interesses ou atividades”². A epidemiologia da doença no Brasil ainda é pouco estudada, porém sabe-se que a prevalência está crescendo, assim como no resto do mundo³. Em 2010, avaliava-se que existiam mais de 500 mil pessoas com autismo no país, dados que podem estar subestimados⁴. Nos Estados Unidos, estima-se que uma a cada sessenta e oito crianças nascidas vivas tenham a doença, causando um custo social de \$130 bilhões de dólares anualmente⁵.

Apesar do progresso no que concerne ao conhecimento das manifestações clínicas e da epidemiologia, a fisiopatologia e etiologia do autismo ainda são incertas³. A doença é causada por uma série de fatores genéticos e ambientais e acredita-se que mais de 100 genes estão relacionados com a expressão do fenótipo do TEA⁶, sendo os genes *SCN2A* e *RELN* uns dos mais proeminentes^{7,8}. Esse primeiro está presente no cromossomo 2 e é transcrito e traduzido no canal $Na_v1.2$ que é responsável pela plasticidade das sinapses nos primeiros dois anos de vida⁹. Enquanto o gene *RELN* está presente no braço longo do cromossomo 7 e é encarregado de codificar uma glicoproteína que está envolvida na migração neuronal⁸. Logo, a ocorrência de mutações associadas com esses genes pode alterar as propriedades biofísicas dos neurônios^{8,10} concorrendo para os sintomas do TEA.

O estudo fisiopatológico desses importantes genes é complexo por fatores tanto éticos quanto procedimentais. Uma opção possível são as células tronco pluripotentes induzidas pelo homem (iPSCs), que podem ser utilizadas por se tratar de um modelo que reestabelece o desenvolvimento celular, mantendo o genoma. As iPSCs apresentam características similares às células tronco embrionárias presentes nas células internas do blastocisto, podendo, assim, se diferenciar nos três folhetos embrionários (ectoderma, mesoderma e endoderma)¹¹. Elas foram descobertas em 2006 por Takahashi e Yamanaka apresentando, desde então, um potencial crescente para o estudo de doenças congênitas e neurológicas, como o autismo.

No estudo das iPSCs, o modelo mais bem fundamentado para abordar doenças neurológicas é a cultura em três dimensões. Ela consiste na diferenciação das células tronco pluripotentes em

células tronco neuronais (NSC) e por fim neurônios, em uma plataforma em que as mesmas fiquem suspensas em meio líquido. Essa suspensão pode ser feita através de organoides cerebrais¹² ou de neuroesferas¹³. A diferença básica entre essas duas culturas é que a primeira forma um tecido regionalizado, que traz uma organogênese cerebral simplificada¹⁴. Enquanto as neuroesferas, denotam um modelo mais homogêneo, sem segmentações, mas que pode ser mais útil a depender dos objetivos pretendidos.

Assim, a formação de organoides e de neuroesferas a partir de iPSCs normais, com mutação em heterozigose e *knockout* são um bom modelo para investigar o papel de variantes gênicas de risco para o autismo na migração neuronal, demonstrando possíveis alterações fisiopatológicas. Nessa perspectiva, o presente trabalho se propõe a trazer um cenário metodológico inovador para estudar particularidades do TEA, que podem trazer pistas para elucidar aspectos etiológicos e fisiopatológicos do transtorno.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Primário:

Investigar, através de modelos 3D de diferenciação, o papel dos genes *SCN2A* e *RELN* na migração neuronal em pacientes autistas e controles.

2.2 Objetivos Secundários:

- Produzir organoides cerebrais e neuroesferas a partir de iPSCs com *SCN2A* normal, mutação em heterozigose e *knockout*;
- Avaliar morfológicamente a estrutura dos organoides e expressão de marcadores de diferenciação neural;
- Avaliar comparativamente a migração neuronal entre ensaios *in vitro* nos modelos 3D de diferenciação.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Autismo

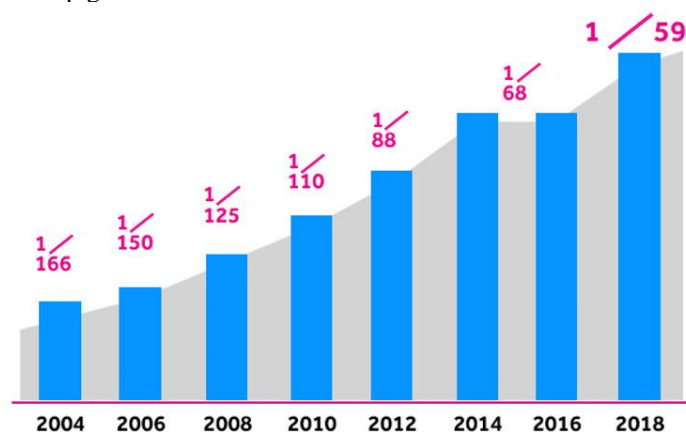
Em 1943, Kanner publicou uma série de casos de crianças que possuíam distúrbios no contato afetivo que possibilitaram classificar o autismo como uma doença pela primeira vez¹. Atualmente sabe-se que a apresentação clínica da patologia é, na verdade, muito mais variada do que se imaginava e, por isso, as novas formulações trazem o Transtorno do Espectro Autista (TEA) como o nome mais apropriado. O TEA engloba transtornos antes chamados de autismo infantil, autismo de Kanner, autismo de alto funcionamento, autismo atípico, transtorno global do desenvolvimento sem outra especificação, transtorno desintegrativo da infância e transtorno de Asperger, sendo portanto bastante variado na sua sintomatologia².

A fim de diagnosticar o TEA, o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DMS-5) traz que é necessário haver sintomas desde as fases mais precoces do desenvolvimento e esses devem afetar de forma clinicamente significativa o desempenho social e profissional do paciente. Por fim, “déficits persistentes na comunicação social e na interação social” como dificuldade de estabelecer uma conversa normal e compartilhar interesses em comum são característicos da patologia. Assim como “padrões restritos e repetitivos de comportamento” *e.g.* movimentos e falas estereotipadas ou mesmo interesses fixos em determinado assunto. Também é essencial graduar o nível de dependência do paciente em relação aos seus cuidadores em uma escala que vai de 1 a 3, em que 1 exige apoio, 2 apoio substancial e 3 apoio muito substancial². Portanto, o diagnóstico é estritamente clínico e depende de um profissional treinado para realiza-lo com maestria, esse fato, contudo, avanta a possibilidade de subnotificação dos casos e dificuldade no estabelecimento de uma epidemiologia mais verossímil para a doença.

Algumas publicações, no entanto, vêm tentando estabelecer um quadro epidemiológico para o autismo. Afirma-se que 1 a cada 54 crianças nascidas vivas tenham a doença nos Estados Unidos, sendo quatro vezes mais comum em meninos do que em meninas, com uma prevalência estimada de 1-2%, levando em conta dados relatados na América do Norte, na Europa e na Ásia¹⁵. É importante destacar que a prevalência e a incidência da doença vem crescendo ao longo dos anos, em 1970 Treffert encontrou uma prevalência de 0,07-0,31% nos Estados Unidos¹⁶, enquanto em 2016 Christensen *et al.* encontrou uma taxa de 8,2-24,6% no mesmo país¹⁵. É compreensível que parte desse aumento seja explicado pelo maior conhecimento dos médicos sobre o assunto, assim como uma maior definição nos critérios diagnósticos, visto que

o primeiro estudo usou como base a classificação de Kanner e o segundo a do DMS-5. Todavia, é notável também o aparecimento de mais crianças autistas atualmente do que no passado, devido principalmente aos fatores ambientais, mas também aos genéticos (figura 1).

Figura 1 - Prevalência do autismo nos Estados Unidos em diferentes cortes temporais. É possível notar um aumento abrupto na incidência do TEA em um curto intervalo de tempo, passando de 1 caso a cada 166 crianças nascidas vivas em 2004 para 1 caso a cada 59 crianças nascidas vivas em 2018. Isso traz à tona o fato de que o número de diagnósticos aumentou não apenas pelo maior conhecimento da doença pela população médica, mas também pela maior ocorrência dessa patologia nas crianças. O que pode ser explicado por fatores genéticos, mas principalmente ambientais e epigenéticos.



Fonte: Adaptado de MAENNER et al., 2020.

O custo econômico e social é gigantesco, estima-se que só nos Estados Unidos \$130 bilhões de dólares sejam gastos anualmente com cuidados de saúde para as populações com a doença⁵. Ademais, por se tratar de uma patologia com alto grau de dependência, o ônus para os cuidadores também deve ser destacado⁴, assim como as dificuldades de inserção no mercado e trabalho que os pacientes com TEA enfrentarão no decorrer da vida¹⁷.

No Brasil, poucos estudos têm sido implementados a fim de traçar um quadro epidemiológico para o autismo, mas estima-se que, em 2010, 500 mil pessoas tinham a afecção no país⁴. Porém, pelos limites metodológicos das pesquisas e pela extensa subnotificação, os valores são certamente maiores na atualidade. Essa alta prevalência do TEA já foi, inclusive, reconhecida pelo Ministério da Saúde, ao colocar, a partir de 2009, a explicação dos principais sintomas da doença na Caderneta de Saúde da Criança, para que os próprios pais assim como os médicos consigam realizar uma triagem inicial e fazer o encaminhamento para o serviço especializado¹⁸.

Apesar da importância mundial do TEA, nenhum tratamento até então é capaz de curar a patologia. Por se tratar de uma síndrome que engloba uma enorme variedade de manifestações clínicas, as intervenções visam reduzir sintomas específicos de cada paciente, *e.g.* melhorar a habilidade de comunicação social ou mesmo reduzir a intensidade dos comportamentos

estereotipados, visando introduzir essa população na comunidade¹⁹. Tão logo, o acompanhamento deve começar idealmente logo após o diagnóstico e envolver uma equipe multiprofissional treinada contando com médicos generalistas, psiquiatras, psicólogos e terapeutas comportamentais²⁰, porém sabe-se que no Brasil esse cenário quase nunca ocorre e a criança recém diagnosticada fica muitas vezes desamparado no serviço público²¹. Esse fato é ainda mais preocupante quando é demonstrado um maior nível de evidência na intervenção precoce, ainda na infância²², não havendo na literatura bons ensaios clínicos randomizados que norteariam a conduta em indivíduos adultos sem tratamento prévio. Por fim, é preciso enfatizar que autistas também tem outros problemas de saúde e devem receber atenção médica de forma similar a população sem a moléstia e quadros como depressão, ansiedade e automutilação, devem ser tratados prontamente.

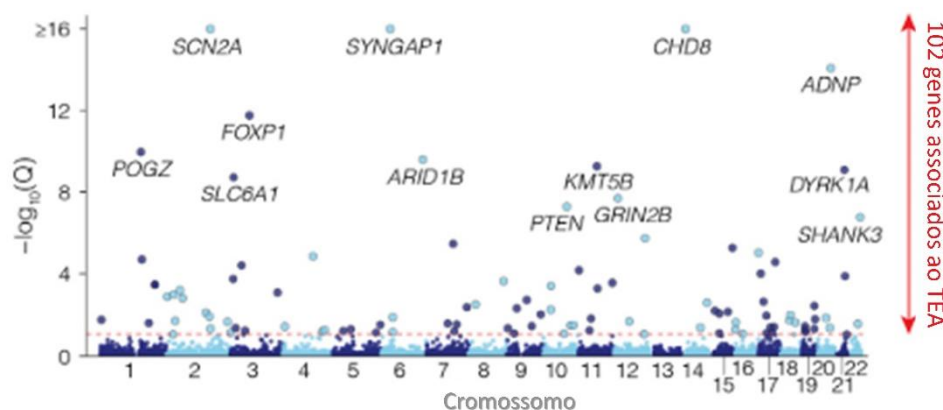
Um importante ponto que dificulta a criação de tratamentos mais eficazes para o TEA é justamente o desconhecimento sobre a sua fisiopatologia e etiologia. A doença ainda tem causas incertas e multifatoriais, incluindo condições ambientais e genéticas³. Diversas pesquisas vêm abordando as possíveis causas ambientais do TEA, Kim *et al.* em 2019 evidenciou em uma revisão sistemática que idade materna acima dos 35 anos, pré-eclâmpsia, uso de antidepressivo durante a gravidez, hipertensão gestacional, hipertensão arterial sistêmica e obesidade, são importantes fatores de risco²³. Já Bölte *et al.* demonstrou em 2018 que diabetes materna, atividade esteroideogênica aprimorada e avanço na idade materna e paterna também contribuem para o aparecimento do autismo²⁴. Em outra revisão sistemática, que analisou as toxinas ambientais nesse contexto, foi expresso que o contato materno ou mesmo infantil com pesticidas, bifenilos policlorados, solventes, metais pesados e poluentes do ar têm forte associação com o TEA²⁵. Alguns estudos, com menor evidência científica, também relataram que eventos inflamatórios em resposta a processos infecciosos durante a gestação também estão associados com a doença, por aumentarem a neuroinflamação e o estresse oxidativo²⁶. Modabbernia *et al.* em uma revisão sistemática com meta análise indicou que complicações no nascimento como trauma e isquemia, assim como cirurgia cesariana levaram a um aumento no risco de desenvolvimento do Transtorno do Espectro Autista. Contudo, vacinação, tabagismo materno e tecnologias de reprodução assistida não expressaram aumento no risco e os elementos nutricionais, como deficiência de ácido fólico ou vitamina D, tiveram resultados inconclusivos no mesmo estudo²⁷.

Os fatores genéticos associados ao TEA podem tanto atingir todo o cromossomo ou parte dele, quanto apenas um *loci* de um gene específico. Essa associação genética é tão forte que patologias neurológicas como a epilepsia, tem maior prevalência na população autista, provavelmente por compartilhamento de defeitos genéticos similares²⁸. Algumas mutações são descritas em neurônios excitatórios ou inibitórios, em diferentes sistemas de neurotransmissores e em células específicas do cérebro anterior ou cerebelo²⁹. Essas mutações causam alterações na síntese de proteínas, transcrição e regulação epigenética e sinalização sináptica se expressando, fenotipicamente, nas diversas formas do autismo³⁰.

Inúmeras alterações nos cromossomos estão relacionadas com o TEA, porém a porcentagem de indivíduos que têm essa como a principal causa desse transtorno é baixa. Cohen *et al.* em 2005 demonstraram que a síndrome de Algehan, a duplicação da parte proximal do braço longo do cromossomo 15 e a síndrome de Down são os distúrbios cromossômicos mais relacionados ao autismo, apesar desta última ainda não ser um consenso³¹.

A grande heterogeneidade no TEA também é vista nos principais genes relacionados com a sua apresentação clínica, mais de 100 deles já foram relacionados à patologia e novas descobertas vem aumentando ainda mais esse número⁶. A principal mutação nos genes que está relacionada ao autismo é a mutação *de novo* do tipo *missense*, uma modificação adquirida na qual a mudança em um simples nucleotídeo resulta na formação de um aminoácido diferente. Porém, outros subtipos também podem aparecer, como a sem sentido, em que uma alteração em um único nucleotídeo gera um códon de parada e finaliza a síntese proteica³². O maior estudo de prevalência genética no autismo já feito, que analisou o exoma de 11.986 pacientes com a doença, expressou que as mutações que mais tem relação com o TEA acometem os genes *SCN2A*, *SYGAP1* e *CHD8*³³ (figura 2). Outros estudos também tem demonstrado, com menor grau de evidência, a associação do gene *RELN* com esse mesmo distúrbio do neurodesenvolvimento³⁴.

Figura 2 - Genes relacionados ao transtorno do espectro autista. Dezenas de genes foram relacionados com a doença e o gráfico expressa a importância de cada gene nesse cenário. O eixo X representa em qual cromossomo o gene está inserido e o eixo Y denota quão forte é a associação entre a mutação genética e o desenvolvimento do TEA. Logo, é possível notar que os genes *SCN2A*, *SYNGAP1* e *CHD8* são os mais relacionados a patologia.



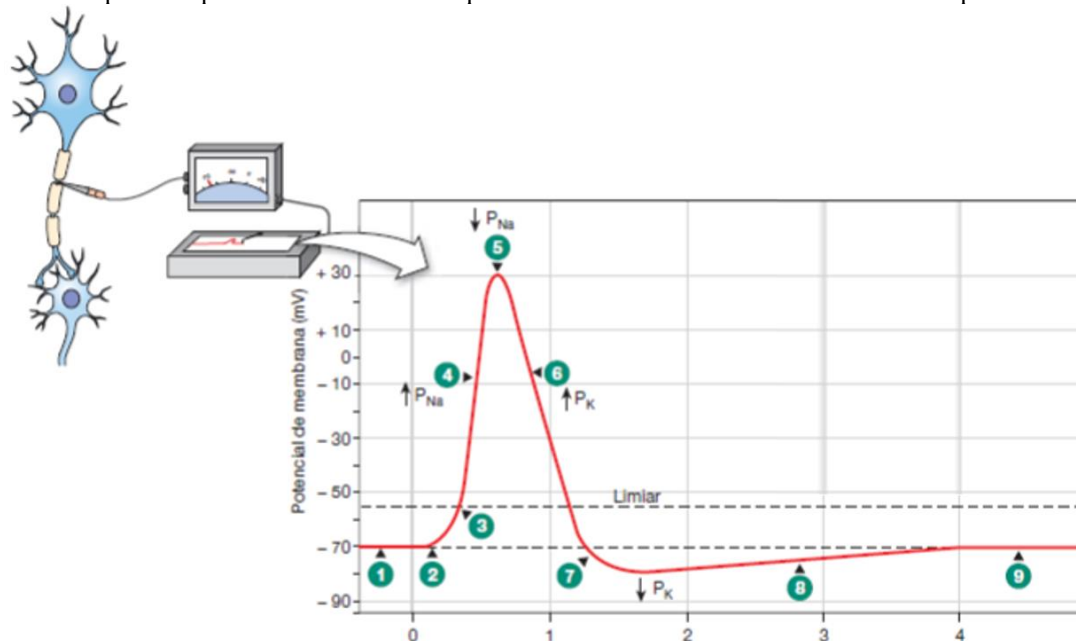
Fonte: Adaptado de Satterstrom *et al.*, 2020.

3.2 *SCN2A*

O gene *SCN2A* está presente no cromossomo 2, na banda 2q24, e é responsável pela codificação da proteína $Na_v1.2$, que é um canal de sódio voltagem-dependente³⁵. Essa proteína é expressa nas fases mais iniciais do desenvolvimento, pois a partir do segundo trimestre da gestação ela começa a ser substituída pelo canal $Na_v1.6$, codificado pelo gene *SCN8A*. Tal fato é de extrema importância para a manutenção da normalidade no que concerne a transcrição genética e a plasticidade das sinapses⁹.

Os canais de sódio, são de extrema importância para a manutenção da dinâmica do potencial de ação dos neurônios e, assim, da transmissão do impulso nervoso como um todo. A abertura deles possibilita a despolarização da membrana plasmática de $-70mV$ para $+30mV$. Esse estímulo promove a abertura de canais de cálcio no terminal do axônio que, por fim, irão viabilizar na liberação dos neurotransmissores na fenda sináptica e a passagem do estímulo para outros neurônios. O retorno a homeostasia é, então, alcançado pela abertura de outros canais, agora de potássio, que irão repolarizar a membrana fazendo-a retornar para uma diferença de potencial (DDP) de $-70mV$. A redistribuição dos íons pode, desse modo, ser feita pela bomba de sódio-potássio³⁶ (figura 3).

Figura 3 - Alterações no potencial de membrana dos neurônios. Mudanças na permeabilidade dos íons ao longo do axônio geram mudanças na voltagem. O ponto 1 representa o potencial de membrana em repouso (-70mV), quando o estímulo despolarizante ocorre (2), os canais de sódio dependentes de voltagem se abrem (3) e possibilitam a despolarização da célula pela entrada desse íon (4). Então, os canais de sódio se fecham e os canais de potássio lento se abrem (5), a saída desse íon promove uma queda no potencial de membrana até sua hiperpolarização (6 e 7). Por fim, os canais de potássio se fecham e a célula retorna à normalidade (8 e 9). A bomba de sódio potássio promove o retorno do equilíbrio iônico e assim a homeostase no compartimento intracelular.



Fonte: Adaptado de SILVERTHORN, 2017.

Devido a toda essa importância que os canais iônicos tem na fisiologia normal da transmissão sináptica, vários estudos aventaram a possibilidade de que as canalopatias estivessem envolvidas em diversos distúrbios neuronais, dentre eles o autismo³⁷. Como já relatado, uma das mutações com maior evidência de aumento do risco para o desenvolvimento do TEA é justamente a que atinge o gene *SCN2A*, tornando mais plausível a possibilidade de que uma das causas do autismo seja uma canalopatia. Diversas mutações já foram relatadas nesse gene, porém aquelas que acarretam a perda da função do canal parecem estar mais fortemente relacionadas ao desenvolvimento do distúrbio social do TEA^{7,10}.

A relação entre a disfunção do Na_v1.2 e o desenvolvimento do autismo ainda é incerta e mais estudos precisam ser realizados para elucidar essa associação³⁸. Algumas pesquisas *in vivo* vêm tentando entender o cenário, porém várias limitações ocorreram. Por exemplo, Lena e Mantegazza testaram, em 2019, se uma espécie de ratos, que era *knockout* para o gene *SCN2A*, desenvolveriam o fenótipo autista e, surpreendentemente, os sintomas que marcam a doença foram atenuados com a idade, fato que não é visto em humanos³⁹. Tal circunstância ratifica a afirmação de que estudos fisiopatológicos em camundongos não refletem necessariamente a complexidade dos organismos de primatas mais complexos. Assim sendo, é essencial o

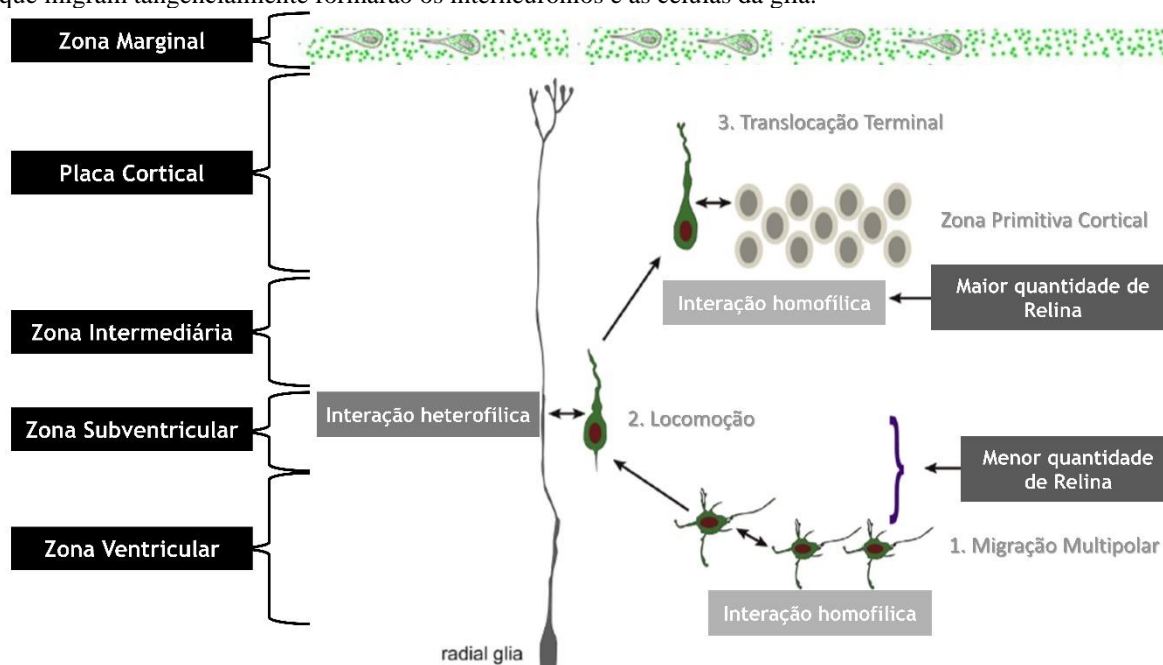
desenvolvimento de pesquisas com células ou mesmo tecidos humanos, o que esbarra em fortes limitações éticas, por se tratar da realização de testes em células embrionárias e fetais humanóides.

O melhor conhecimento desses mecanismos etiológicos e fisiopatológicos levantaria a possibilidade da criação de terapias genéticas. Com o pouco conhecimento que a comunidade médica tem sobre o assunto, alguns artigos de tratamento específico para pacientes autistas com mutação no gene *SCN2A* já começaram a ser feitos e divulgados *e.g.* as publicações de Wolff *et al.* em 2017⁴⁰ e de Sanders *et al.* em 2018⁴¹. Ademais, ensaios de drogas que têm como alvo terapêutico os canais de sódio já estão começando a ser feitos⁴², porém ainda se está longe de conseguir algum resultado promissor, justamente pelo desconhecimento geral por trás dos mecanismos fisiopatológicos do TEA.

3.3 RELN

O gene da relina está presente no *loci* 7q22.1 e é transcrito e traduzido em uma grande glicoproteína que é excretada para o meio extracelular, sendo envolvida na migração neuronal durante o neurodesenvolvimento e na regulação da função pós-sináptica pós-natal³⁴. No córtex em amadurecimento, as células progenitoras começam a se multiplicar na zona ventricular e, à medida em que vão ficando mais maduras, se deslocam em direção a placa cortical. A principal proteína envolvida nesse processo é a relina, ela é expressada nos neurônios de Cajal que se encontram na zona marginal, mediando e estabilizando o processo de migração ao passo que também fornece um sinal de parada quando necessário (figura 4). Na vida adulta, ela está em locais relacionados a plasticidade sináptica e a neurotransmissão excitatória, sendo assim importante nos processos de aprendizado e memória^{43,44}.

Figura 4 - Modelo das fases de migração neuronal durante o desenvolvimento. Na primeira fase, os neurônios recém-formados na zona ventricular, após a transformação da morfologia multipolar para bipolar, começam lentamente a migrar para a área mais externa. Tal fato ocorre devido a sinalização promovida pela liberação de relina pelas células de Cajal, presentes na Zona Marginal. Após isso, quando as terminações axonais estão inseridas na zona marginal, o movimento cessa e os corpos dos neurônios permanecem na placa cortical. É importante destacar que as células que migram de maneira radial darão origem as seis camadas do córtex cerebral, enquanto as que migram tangencialmente formarão os interneurônios e as células da glia.



Fonte: Adaptado de MABEL, 2017 e de SEKINE *et al.*, 2014.

Em humanos, as mutações do gene *RELN* estão associadas a diversos distúrbios do desenvolvimento neuronal, como esquizofrenia, transtorno bipolar e o próprio autismo⁸. Mais de 40 tipos de mutações já foram identificadas nesse gene, porém quase nenhuma delas foi funcionalmente caracterizada quanto ao desenvolvimento ou não do TEA⁴⁵. Porém, um estudo *in vivo* demonstrou redução na secreção de relina e aumento na secreção da proteína ER-chaperona, que está relacionada a patologias neuronais, sugerindo assim uma relação entre essa modificação e o autismo⁴⁶. Ademais, outra pesquisa envolvendo 95 pacientes italianos e 186 controles demonstrou aumento do risco no desenvolvimento de autismo nos pacientes com mutação no gene *RELN*⁴⁷. Contudo, uma revisão sistemática com meta análise não demonstrou qualquer associação entre a doença do neurodesenvolvimento e a mutação da relina, encontrando significância estatística apenas em uma análise por subgrupo em asiáticos⁴⁸. Todavia, outro estudo refutou essa associação por não demonstrar aumento no risco na população indiana⁴⁹, deixando ainda mais incerta se a mutação é ou não um fator de risco.

Deste modo, é necessário incentivar mais estudos na área a fim de entender a real relação entre mutações no gene *RELN* e o desenvolvimento do TEA. Ainda assim, é provável que

eventos genéticos e ambientais atuam em sinergismo para reduzir a níveis críticos a relina no cérebro, possibilitando a ocorrência da patologia⁵⁰.

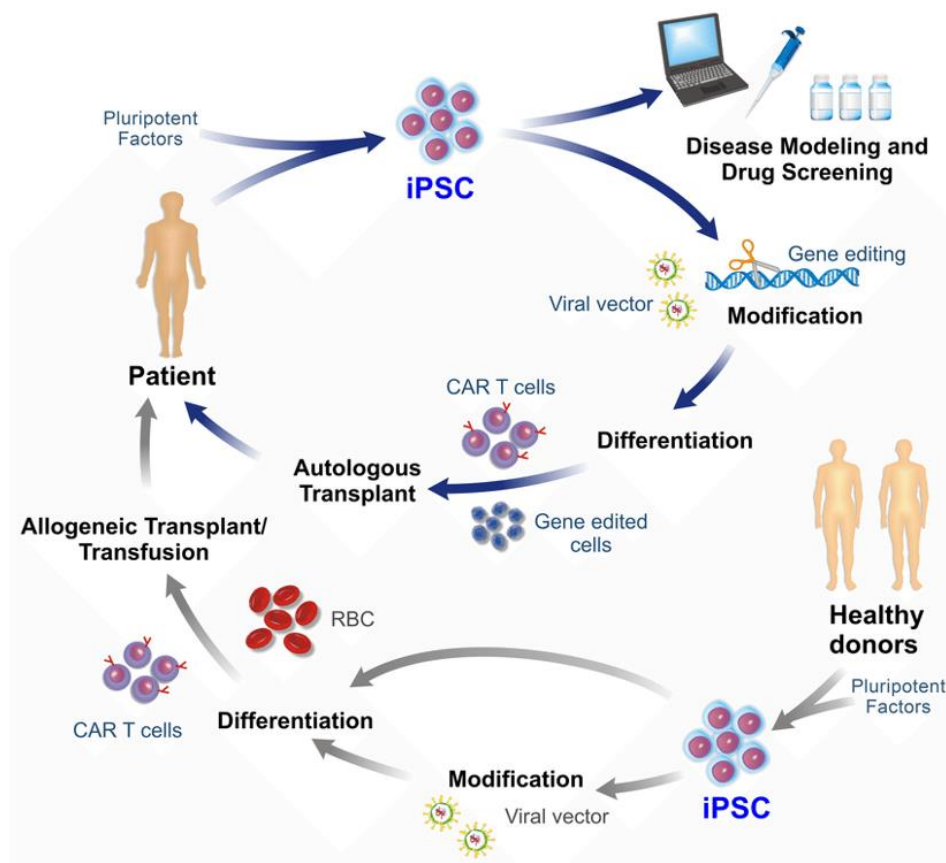
3.4 iPSCs

Até 2006 o estudo etiológico de doenças do neurodesenvolvimento, como o autismo, era extremamente dificultado por fatores éticos relacionados a aquisição de células troncos humanoides assim como a obtenção de tecidos de difícil acesso, *e.g.* o neuronal. A pesquisa de Takahashi e Yamanaka modificou completamente esse cenário e deu a eles o prêmio Nobel de medicina em 2012. Partindo-se do pressuposto que todas as células somáticas, assim como todas as células pluripotentes, têm o mesmo material genético, alterando apenas os genes ativados e os inativados nas histonas, eles selecionaram diversos fatores que induzem a expressão de genes de pluripotência em células somáticas. Assim, foi possível, pela primeira vez na história “involuir” uma célula, transformando-a novamente em pluripotente⁵¹.

Deste modo, por meio da inserção através de vetores episomais, foi possível alocar quatro principal fatores de desdiferenciação: OCT4, SOX2, NANOG e LIN28, gerando, com isso, células tronco pluripotentes induzidas pelo homem (iPSCs)⁵². Elas podem ser feitas a partir de qualquer célula somática, como fibroblastos, células epiteliais ou mesmo células sanguíneas. Quando formadas, tem as mesmas propriedades de uma célula tronco pluripotente, ou seja, podem se diferenciar nos três folhetos embrionários: ectoderma, endoderma e mesoderma (*i.e.*, tem a capacidade de gerar qualquer célula do corpo humano)⁵³.

Isso as torna excepcionalmente importantes no estudo de patologias genéticas ou de tecidos de difícil acesso, como o TEA. Desde então, a possibilidade de desdiferenciar uma célula somática de um indivíduo doente e, mantendo o genoma, diferencia-la novamente em um neurônio, por exemplo, trouxe mudanças significativas no entendimento da origem de certas patologias. Além disso, por serem pluripotentes, essas células se dividem indefinidamente em laboratório, facilitando o trabalho dos pesquisadores, que também não precisam mais lidar com fatores éticos relacionados ao cultivo de células embrionias, como era anteriormente feito. Esses fatos, possibilitam a formação de estudo fisiopatológicos, que identificam possíveis défices moleculares e possibilitam a criação de novas terapias^{54,55} (figura 5).

Figura 5 - Esquema mostrando alguns dos usos para as iPSCs. A inserção de fatores de pluripotência em células somáticas gera as iPSCs, que podem ser usados para a terapia gênica com transplantes autólogos e homólogos, através de técnicas de edição gênica. Além disso, elas podem ser também utilizadas para o estudo fisiopatológico de doenças e para a testagem de drogas, trazendo a possibilidade de uma medicina individualizada.

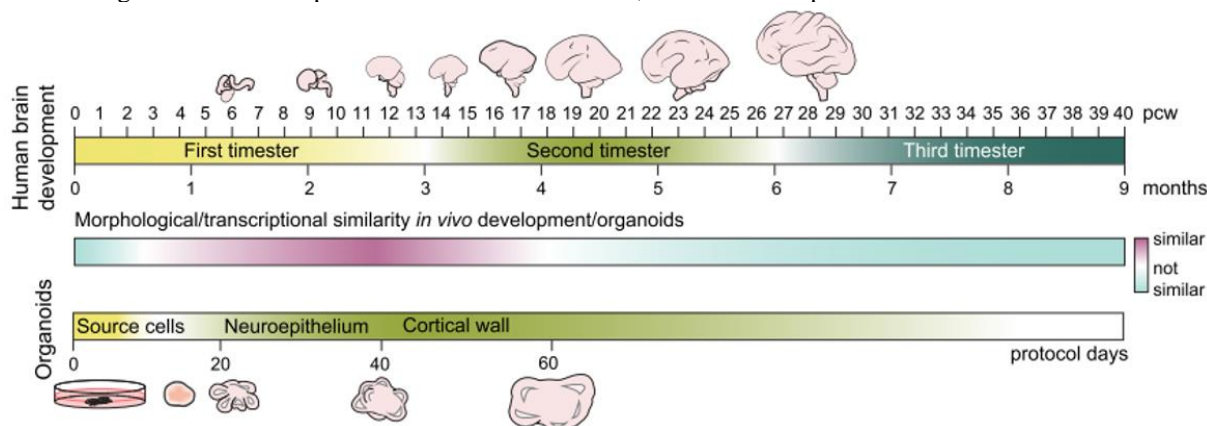


Fonte: Paes *et al.*, 2017.

3.5 Organoides cerebrais

Um modelo de diferenciação celular amplamente utilizado no estudo de diversas patologias do sistema nervoso são os organoides cerebrais. Eles são derivados de células tronco embriológicas ou induzidas pelo homem e expressam um modelo de diferenciação em três dimensões que tenta recapitular o neurodesenvolvimento humano, originado, no final do processo, diversos tipos celulares como células tronco neuronais (NSC) e, até mesmo, neurônios e células da glia⁵⁶. O organoide cerebral, assim como o amadurecimento normal do encéfalo *in vivo*, se segmenta em três grandes regiões: a zona ventricular, onde estão as células progenitoras, a zona subventricular e a placa cortical, onde as células migram a medida que se tornam mais diferenciadas⁵⁷. Além disso, eles também conseguem se organizar de maneira segmentada em prosencéfalo, mesencéfalo e telencéfalo, de forma similar à vista em humanos^{14,58}, recapitulando, até mesmo, a expressão de genes no neocórtex em comparação ao feto⁵⁹ (figura 6).

Figura 6 - Linha do tempo comparativa entre o desenvolvimento cerebral humano e o desenvolvimento de organoides. É possível notar certa similaridade na embriogênese cerebral humana e na *in vitro*, porém há limites para esse processo. No início da formação da cultura em 3D, quando os organoides ainda não estão diferenciados, eles são chamados de corpos embrioides e não tem muita similaridade a evolução cerebral. Além disso, enquanto o cérebro continua a se diferenciar, ficando cada vez mais complexo a partir da vigésima semana, os organoides não conseguem mais acompanhar esse amadurecimento, sendo um importante fator limitante do método.



Fonte KELAVA; LANCASTER, 2016.

Por reestabelecerem, até certo ponto, a organogênese do sistema nervoso, os organoides cerebrais causaram uma enorme transformação no estudo de diversas patologias neuronais, como microcefalia¹⁴, heterotopia⁶⁰ e autismo⁵⁴. Eles podem até mesmo ser usados na testagem de drogas ou para verificar a influência ambiental no neurodesenvolvimento, como já tem sido feito no contexto do TEA⁶¹. Assim, os organoides têm servido para fazer uma aproximação maior entre a pesquisa básica e a clínica, sendo utilizado também com o intuito de promover uma “medicina individualizada”. Por fatores metodológicos ainda não é possível um uso clínico universal, porém estudos vem aventando a possibilidade de testar drogas em organoides cerebrais derivados de paciente e isso traria enormes avanços no campo na oncologia, por exemplo (i.e., como os organoides imitam o cérebro humano do paciente em que as células foram retiradas, seria possível uma testagem mais específica de drogas, melhorando a performance do tratamento)⁶².

Contudo, numerosos problemas ao uso de organoides cerebrais já foram relatados, como o alto custo e uma certa dificuldade na reprodutibilidade das amostras. Além disso, o modelo ainda não imita com precisão o complexo cérebro humano, tornando muitas vezes complicado o emprego metodológico⁶³. Um artigo publicado em 2020 de Bhaduri *et al.* deixou em cheque a ideia de “brain in a dish” (i.e., em tradução livre, cérebros em um prato) que antes era amplamente difundida sobre os organoides, expressando que eles apresentam certa desorganização quando comparados ao novo atlas de desenvolvimento cerebral⁶⁴.

3.6 Neuroesferas

As neuroesferas são outro modelo de diferenciação em três dimensões sendo, contudo, menos estudado do que os organoides por serem mais simples e não reestabelecerem um processo similar a organogênese cerebral. Ainda assim, elas são utilizadas em ensaios farmacológicos e toxicológicos, como também em estudos fisiopatológicos⁶⁵. Por serem mais simples, o custo social e financeiro relacionado ao processo é menor, bem como a redução das inúmeras variáveis presentes nos organoides, o que é ótimo para estudos que querem focar em um ou dois parâmetros de análise.

A sua geração difere e muito da dos organoides cerebrais, elas não são formadas diretamente das iPSCs e sim de células troncos neuronais (NSC). As NSC, no passado, eram extraídas do cérebro de mamíferos, sendo essa uma grande limitação ao uso dessa metodologia⁶⁶. Entretanto, com a descoberta das iPSCs em 2006 se tornou possível a geração de NSC sem o uso de animais, o que facilitou o processo. Atualmente, existem protocolos sistematizados que visam a formação de NSC a partir de iPSCs¹³ e a formação de neuroesferas a partir de NSC⁶⁵, o que deixou o trabalho mais uniformizado.

Com isso, diversos estudos começaram a utilizar as neuroesferas como uma forma mais simples, barata e igualmente eficaz para cumprir seus objetivos. Cheng *et al.* em 2016 utilizou as neuroesferas a fim de descobrir um novo tratamento para patologias neurointestinais, obtendo resultados promissores e abrindo a possibilidade para o uso de neuroesferas na terapia genética⁶⁷. Hellwig *et al.* em 2018 realizou um estudo a fim de criar uma plataforma para teste de neurotoxicidade no desenvolvimento utilizando neuroesferas⁶⁸. Por fim, no que concerne ao TEA, as NSC e as neuroesferas, apenas dois trabalhos encontrados até então utilizaram essa metodologia. Mazur-Kolecka *et al.* mostrou, em 2007, uma redução na proliferação, mas um aumento da migração celular em NSC advindas de pacientes saudáveis colocadas em contato com um meio de cultura que continha soro sanguíneo de pacientes autistas⁶⁹. Em 2019, Lewis *et al.* realizou uma caracterização celular e molecular do autismo multiplex em neurônios derivados de iPSCs⁷⁰. Até o presente momento não foram encontrados nenhum estudo que utilize metodologia similar a realizada neste trabalho, visando a elucidação dos processos fisiopatológicos no TEA.

4 METODOLOGIA

4.1 População do estudo

Os organoides e as neuroesferas gerados nesse trabalho foram produzidas a partir de linhagens iPSCs obtidas de três indivíduos. Um desses era portador do TEA e dois eram adultos saudáveis, sem diagnóstico da doença.

4.2 Considerações éticas e aspectos organizacionais

Todos os procedimentos foram previamente autorizados pelos voluntários ou pelos seus familiares através do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) ou do Termo de Assentimento Livre e Esclarecido (Apêndice A). Este estudo recebeu prévia autorização do comitê de ética em pesquisa do Hospital São Rafael (CAAE: 08601919.8.0000.0048), disponível no Apêndice B. O orçamento do projeto, assim como seu cronograma estão disponíveis nos apêndices C e D, respectivamente.

4.3 Geração e caracterização das iPSCs

Essa etapa, previamente feita a esse trabalho, levou à geração de iPSCs a partir de células estromais da medula óssea, através do método de nucleofecção com vetores episomais^{71,9}. Estas células se encontravam criopreservadas no biorrepositório do Hospital São Rafael e já haviam sido previamente caracterizadas como células pluripotentes.

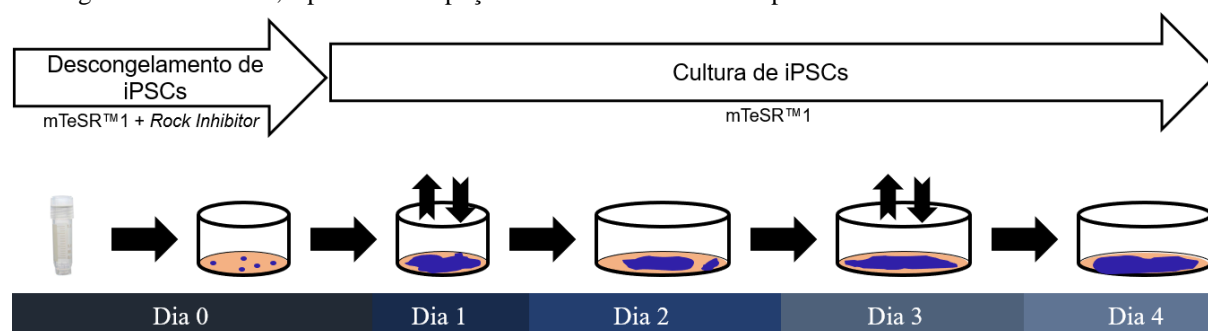
4.4 Cultura de iPSCs

As células iPSCs, previamente geradas, foram descongeladas do biorrepositório do Hospital São Rafael. No dia zero, criotubos, contendo os tipos celulares EB4 (doador saudável), EA1 (doador saudável), EB4CRISPR (*knockout* para o gene *SCN2A*) e iM5 (paciente autista com mutação no gene *SCN2A*), foram descongelados em banho maria a 37°C. O seu conteúdo foi pipetado, com uma pipeta de 5 ml, em um tubo Falcon de 15 ml, que já continha previamente 3 ml de mTeSRTM1. Os tubos de 15 ml foram centrifugados a 340x g por 5 min, após isso, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* aderido foi ressuspensionado com 1 ml de mTeSRTM1 contendo 2 µl/ml de *Rock Inhibitor*, para inibir a morte de células. As células foram plaqueadas em um poço de uma placa de 12, que já continha geltrex (matriz extracelular necessária para adesão das iPSCs e de outros tipos celulares à superfície de cultura).

No dia 1, o meio de cada poço foi trocado a fim de remover o *Rock Inhibitor*. No dia 2 foi realizada a passagem dessas células, inicialmente, todo o mTeSRTM1 que continha no poço

foi retirado, sendo colocado 500 μ l de EDTA. Após quatro minutos em temperatura ambiente, o EDTA foi retirado e o poço foi lavado com 1 ml de mTeSR™1 fazendo com que as colônias aderidas se desprendessem. Todo o conteúdo do poço foi então retirado com uma pipeta de 5 ml, para que os grumos de células não se desfizessem, e pipetados em um poço de uma placa de 6, que já continha previamente geltrex. Por fim, 1 ml de mTeSR™1 foi adicionado no poço para completar o volume necessário. No dia 3, os poços tiveram seus meios trocados. No dia 4, as células foram enfim utilizadas para realizar o protocolo de formação de organoides cerebrais descrito a seguir. A figura 7 esquematiza o processo acima abordado.

Figura 7 - Fluxo de cultura de células iPSCs. No dia 0, os clones EB4, EA1, EB4CRISPR e iM5 foram descongelados e passados, cada um, para um poço de uma placa de 12. No dia 1, o meio foi trocado para se retirar o *Rock Inhibitor*. No dia 2, foi feita a passagem das células para um poço de uma placa de 6, devido a boa confluência observada. No dia 3, ocorre a troca de meio nos poços. No dia 4, inicia-se o protocolo de formação dos organoides cerebrais, a partir de um poço com uma confluência de pelo menos 80%.



Fonte: Próprio autor.

4.5 Geração de organoides cerebrais

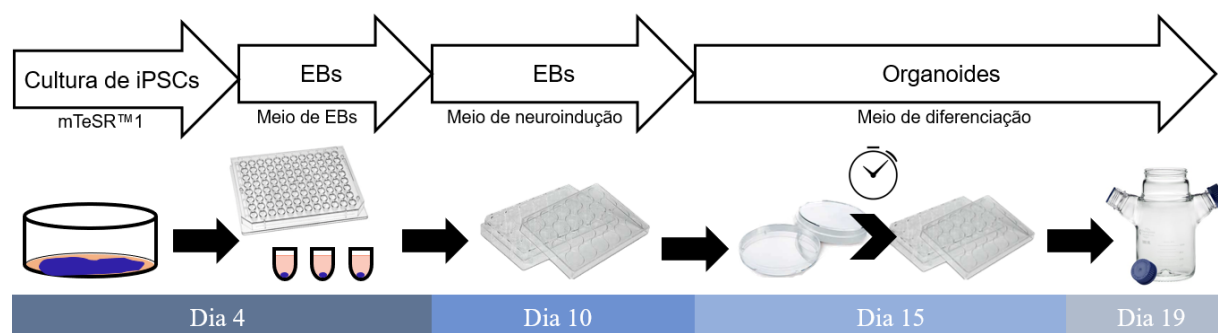
Quando os poços de iPSCs atingiram uma confluência em torno de 80%, os corpos embrioides (EBs) foram gerados, usando a mesma técnica para todos os tipos celulares. Inicialmente todo o mTeSR™1 que havia no poço foi retirado, sendo colocado 1 ml de *Accutase*. Após três minutos, a *Accutase* foi retirada e o poço foi lavado com 1 ml de DPBS 1x fazendo com que as colônias aderidas se desprendessem. Todo o conteúdo do poço foi então retirado com uma pipeta de 1 ml e pipetado em um tubo de 15 ml, adicionando *Rock Inhibitor* sob uma concentração final de 10 μ M, para inibir a morte das células. O tubo foi centrifugado por 5 min a 340x g. Após descartar o sobrenadante, o *pellet* foi ressuspensionado com 1 ml de meio de EBs {DMEM/F12 suplementado com KSR (20%), ESC-quality FBS (3%), PenStrep (1%), GlutaMAX (1%), MEM – NEAA (1%), 2-mercaptoetanol (0,07%), iROCK (50 μ M) e bFGF (4 ng/ml)}. Seguiu-se então a contagem de células na câmara de Neubauer e o cálculo de células por poço. No experimento foram usadas 9×10^3 células por poço. Após a contagem, as células

foram adicionadas em uma placa de 96 com fundo em U não aderente e ela foi centrifugada a 100 x g por 1 minuto.

No dia 6 e no dia 8, os poços tiveram metade de seus meios trocados. No dia 10, os EBs foram transferidos da placa de 96 para uma placa de 24 não aderente, tendo o seu meio alterado para o meio de neuroindução {DMEM/F12 (96%), N2 (1%), Glutamax (1%), MEM – NEAA (1%), PenStrep (1%), solução de heparina (1 µg/ml)}. Nos dias 12 e 14, os poços tiveram metade de seus meios trocados. No dia 15 os organoides foram passados para uma placa de 60MM não aderente e foram incubados na estufa à 37°C e 5% CO₂ por 1h em Matrigel diluído em DMEM/F12. Após a incubação, os organoides foram realocados nas placas de 24 não aderentes, porém agora com um novo meio, o de diferenciação {DMEM/F12 :Neurobasal (1:1) suplementado com N2 (0,5%), B27 SEM suplemento de vitamina A (1%), Insulina (0,025%), 2-ME diluído em 1:100 em DMEM/F12 (0,035%), Glutamax (1%), MEM – NEAA (0,5%), PenStrep (1%)}. No dia 17 do protocolo, outra troca de meio foi realizada, da mesma forma que as anteriores.

No dia 19, os organoides foram passados da placa de 24 não aderente para um *Spinner Flask*, que foi preenchido com 50 ml de meio de diferenciação modificado {DMEM/F12 :Neurobasal (1:1) suplementado com N2 (0,5%), B27 COM suplemento de vitamina A (1%), Insulina (0,025%), 2-ME diluído em 1:100 em DMEM/F12 (0,035%), Glutamax (1%), MEM – NEAA (0,5%), PenStrep (1%)}. O *Spinner Flask* foi deixado sob uma rotação de 80 rpm em uma estufa à 37°C e 5% CO₂. A cada três ou quatro dias o *Spin* tinha metade do seu meio trocado. O tempo mínimo de amadurecimento dos organoides no *Spinner Flask* foi de 30 dias e, só após esse período, alguns testes puderam ser realizados. A figura abaixo resume o protocolo descrito nesse tópico.

Figura 8 - Fluxo de geração de organoides cerebrais. No dia 4, quando as iPSCs apresentaram boa confluência, elas foram passadas para uma placa de 96 com fundo em U não aderente. Nos dias 6 e 8 os meios dos poços foram trocados. No dia 10, os EBs foram passados para uma placa de 24 não aderente e permanecerem em suspensão. Nos dias 12 e 14, mais uma troca de meio ocorreu. No dia 15, os organoides foram passados para uma placa de 60MM e incubados por uma hora em estufa à 37°C e 5% CO₂ em Matrigel diluído em DMEM/F12. Após esse processo, eles foram recolocados nas placas de 24 não aderentes. No dia 17 houve outra troca de meio. Por fim, no dia 19, os organoides foram passados para um *Spinner Flask* utilizando um meio de diferenciação modificado e foram deixados rotacionar a 80rpm por no mínimo 30 dias antes do início dos testes. As trocas de meio não foram demonstradas nesse fluxo.



Fonte: Próprio autor.

4.6 Imunofluorescência dos organoides cerebrais

Cinco semanas após a passagem dos organoides para o *Spinner Flask*, eles foram fixados para a realização da imunofluorescência. Inicialmente, os organoides foram retirados do *Spinner Flask*, separados individualmente em *ependorfs* e lavados cada um com 1 ml de PBS 1x e colocados em contato com 1 ml de PFA 4% por 20 min. Mais duas lavagens com PBS 1x se sucederam e por fim, 2 ml de sacarose a 30% foram adicionados e os organoides foram deixados a 4°C *overnight*. Após isso, os organoides foram secos, recobertos por *Tissue Tek* e embebidos em nitrogênio líquido até que o *Tissue Tek* passasse de transparente para branco. Enfim, foram feitas secções de 5µm dos organoides e elas foram aderidas em lâminas de vidro anteriormente preparadas com poli-L-lisina, as lâminas foram guardadas em um freezer a -80°C até o uso.

Para a realização da imunofluorescência em si, as lâminas foram retiradas do freezer e fixadas com PFA a 4% por 15 min. Após isso, as lâminas foram lavadas com PBS 1x por três vezes e colocadas em contato com Triton 0,1% por 10 min, sucedendo-se com mais três lavagens com PBS 1x. Enfim, elas foram incubadas com BSA 5% por uma hora, secadas com papel filtro e marcadas com caneta hidrofóbica para delimitar os cortes e impedir que os anticorpos se misturassem. Então, os cortes foram colocados em contato com o anticorpo primário (SOX2 e DCX) *overnight*. No dia seguinte, as lâminas foram lavadas com Tween

0,05% por duas vezes, esperando 5 min em cada lavagem, e com PBS 1x por três vezes. A marcação com a caneta hidrofóbica foi refeita e o anticorpo secundário associado ao fotocromo foi então colocado em contato com os cortes por 40 min, eles foram lavados posteriormente com Tween 0,05% e PBS 1x por duas vezes cada. Os núcleos das células foram marcados com DAPI no final do processo. As imagens geradas foram, por fim, analisadas pelo microscópio confocal A1+ (Nikon).

4.7 Geração das NSC

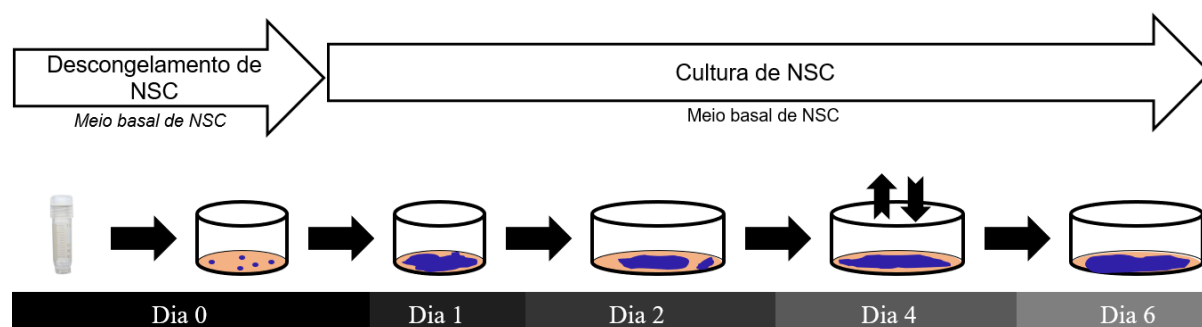
A formação de células tronco neuronais (NSC) foi feita pela equipe do Centro de Biotecnologia e Terapia Celular (CBTC) a partir das iPSCs anteriormente geradas e seguiram um protocolo previamente descrito¹³. Estas células se encontravam criopreservadas no biorrepositório do Hospital São Rafael.

4.8 Cultura das NSC

As células NSC, previamente geradas, foram descongeladas seguindo o protocolo que sucede. No dia 0, os tipos celulares EB4 (doador saudável), EA1 (doador saudável), EB4CRISPR (*knockout* para o gene *SCN2A*) e iM5 (paciente autista com mutação no gene *SCN2A*), foram descongelados em banho maria a 37°C. O seu conteúdo foi pipetado em um tubo Falcon de 15 ml, que já continha previamente 3 ml de DMEM/F12. Os tubos de 15 ml foram centrifugados a 340x g por 5 min, após isso, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* aderido foi ressuscitado com 1 ml de meio basal para NSC {DMEM/F12 :Neurobasal (1:1) suplementado com NIS (2%), PenStrep (1%), Anfotericina B (0,05%)}. As células foram plaqueadas em um poço de uma placa de 12, que já continha geltrex.

No dia 2 foi realizada a passagem dessas células, inicialmente, todo o meio basal de NSC que continha no poço foi retirado, sendo colocado 500 µl de *Accutase*. Após três minutos em temperatura ambiente, a *Accutase* foi retirada e o poço foi lavado com 1 ml de DMEM/F12, fazendo com que as colônias aderidas se desprendessem. Todo o conteúdo do poço foi então retirado e pipetado em um tubo Falcon de 15 ml para então ser centrifugado a 340x g por 5 min. O sobrenadante foi então descartado e o *pellet* aderido foi ressuscitado com 1 ml de meio basal para NSC. Na sequência, o conteúdo do tubo foi plaqueado em um poço de uma placa de 6, que já continha previamente geltrex. No dia 4, os poços de EB4, EA1, EB4CRISPR e iM5 tiveram seus meios trocados. Enfim, no dia 6, as células foram utilizadas para realizar o protocolo de formação de neuroesferas descrito a seguir. A figura 9 esquematiza a cultura de NSC realizada.

Figura 9 - Fluxo de cultura de células NSC. No dia 0, os clones EB4, EA1, EB4CRISPR e iM5 foram descongelados e passados, cada um, para um poço de uma placa de 12. No dia 1, as células continuaram a crescer para serem, no dia 2, passadas para um poço de uma placa de 6, devido a boa confluência observada. No dia 4, ocorreu a troca de meio nos poços. Por fim, no dia 6, o protocolo de formação de neuroesferas foi iniciado, a partir de poços com uma confluência de pelo menos 80%.



Fonte: Próprio autor.

4.9 PCR *real time* das NSC

O RNA dos tipos celulares EB4, EA1, EB4CRISPR e iM5 foi extraído a fim de se fazer o PCR *real time*. Inicialmente, um poço de uma placa de 6 de cada célula, com confluência de cerca de 80%, foi colocado em contato com 1 ml de *Trizol* para a lise da membrana plasmática. Em seguida, o conteúdo dos poços foi retirado e colocado em um tubo de 2 ml, 200 µl de clorofórmio foi adicionado a mistura e ela foi então homogeneizada e centrifugada a 15.000 rpm por 15 min com a centrífuga a 4°C. Somente a parte transparente do conteúdo centrifugado foi retirada e colocada em outro tubo já contendo 500 µl de isopropanol e deixado *overnight* em um freezer a -80°C. No dia seguinte a amostra foi descongelada e novamente centrifugada a 15.000 rpm por 15 min com a centrífuga a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi lavado por três vezes com etanol 70%. Após o conteúdo secar, o *pellet* foi por fim ressuscitado com água DEPC e quantificado no NanoDrop. As amostras foram armazenadas em um freezer a -80°C.

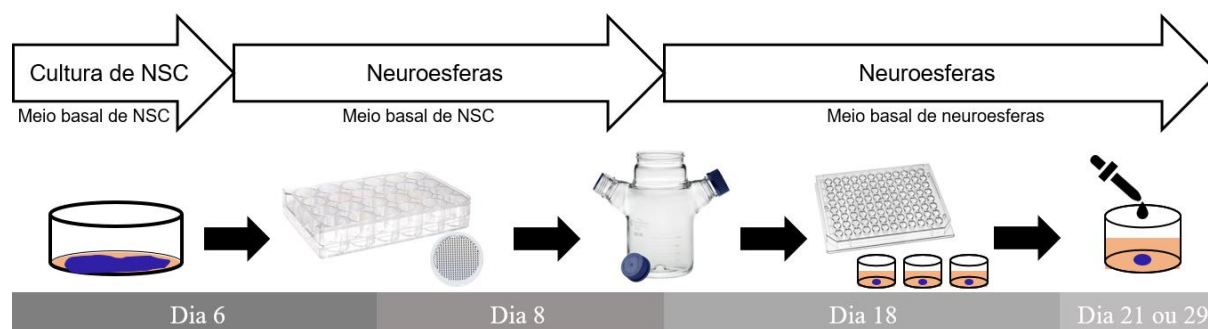
Após isso, o RNA foi processado utilizando o kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific), para produção de DNA complementar (cDNA), seguindo orientações do fabricante do kit¹⁷. Para o PCR *real time*, as amostras de cDNA foram amplificadas utilizando sondas Taqman comercialmente disponíveis para amplificação de genes, os primers empregues foram: GFAP, MAP2 e SOX2. O equipamento utilizado foi ABI Prism 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems). O experimento foi feito em triplicata e as análises foram realizadas utilizando o método delta-delta CT.

4.10 Formação das neuroesferas

No dia 6, quando os poços atingiram uma confluência em torno de 80%, foram geradas neuroesferas usando a mesma técnica tanto para os clones EB4, EA1, EB4CRISPR e iM5. Inicialmente, todo o meio foi retirado do poço, sendo colocado 500 μ l de *Accutase*. Após três minutos, a *Accutase* foi retirada e o poço foi lavado com 1 ml de DMEM/F12 fazendo com que as colônias aderidas se desprendessem. Todo o conteúdo do poço foi então retirado e pipetado em um tubo de 15 ml. O tubo foi centrifugado por 5 min a 340x g. Após descartar o sobrenadante, o *pellet* foi ressuspensionado com 1 ml de meio de meio para NSC. Seguiu-se então a contagem de células na câmara de Neubauer e o cálculo de células por poço da placa de AggreWell. Nesse experimento, foram utilizadas 9×10^3 células por micropoço, o que dá $2,7 \times 10^6$ células por poço da placa de AggreWell. Após a contagem, o volume adequado para a quantidade de células necessárias foi colocado em cada poço e a placa foi centrifugada a 100 x g por 5 min.

No dia 8, as neuroesferas foram retiradas da placa de AggreWell conforme explicação a seguir. Com uma pipeta de 1 ml todo o meio de NSC foi retirado da placa e, agora usando uma pipeta de 5 ml, 2 ml de meio de neuroesferas {DMEM/F12 (47,45%), Neurobasal (50%), N2 1x (0,5%), B27 1x SEM vitamina A (1%), PenStrep (1%), Anfotericina B (0,05%)} foi distribuído firmemente de volta a superfície do poço, a fim de desaloja-las. Com a mesma pipeta, o meio foi retirado e transferido para um *Spinner Flask*, esse processo pode ser repetido até que todas as neuroesferas sejam transferidas. O *Spinner Flask* foi completo até um volume final de 50 ml e colocado sob uma rotação de 90 rpm no *Shaker Orbital* dentro de uma estufa a 37°C e 5% CO₂. O *Spinner Flask* foi deixado rotacionar por dez dias, sendo que ocorreram trocas de meio a cada dois ou três dias. Após esse período, as neuroesferas estão maduras para a realização dos experimentos. Essa técnica está evidenciada na figura 10.

Figura 10 - Fluxo de geração de neuroesferas. O protocolo de formação de neuroesferas se iniciou no dia 6, quando as NSC foram passadas para uma placa de AggreWell, o meio de cultivo, contudo, permaneceu o mesmo. No dia 8, as neuroesferas foram passadas para o *Spinner Flask*, que foi colocado sob uma rotação de 90 rpm no *Shaker Orbital* dentro de uma estufa a 37°C e 5% CO₂. O meio do *Spinner Flask* foi trocado a cada 2 ou 3 dias. No dia 18, o plaqueamento de cada neuroesfera em um poço de uma placa de 96 foi efetuado. No dia 21 ou 29, três ou onze dias após o plaqueamento na placa de 96, as neuroesferas foram fixadas para análise.



Fonte: Próprio autor.

4.11 Análise da migração neuronal

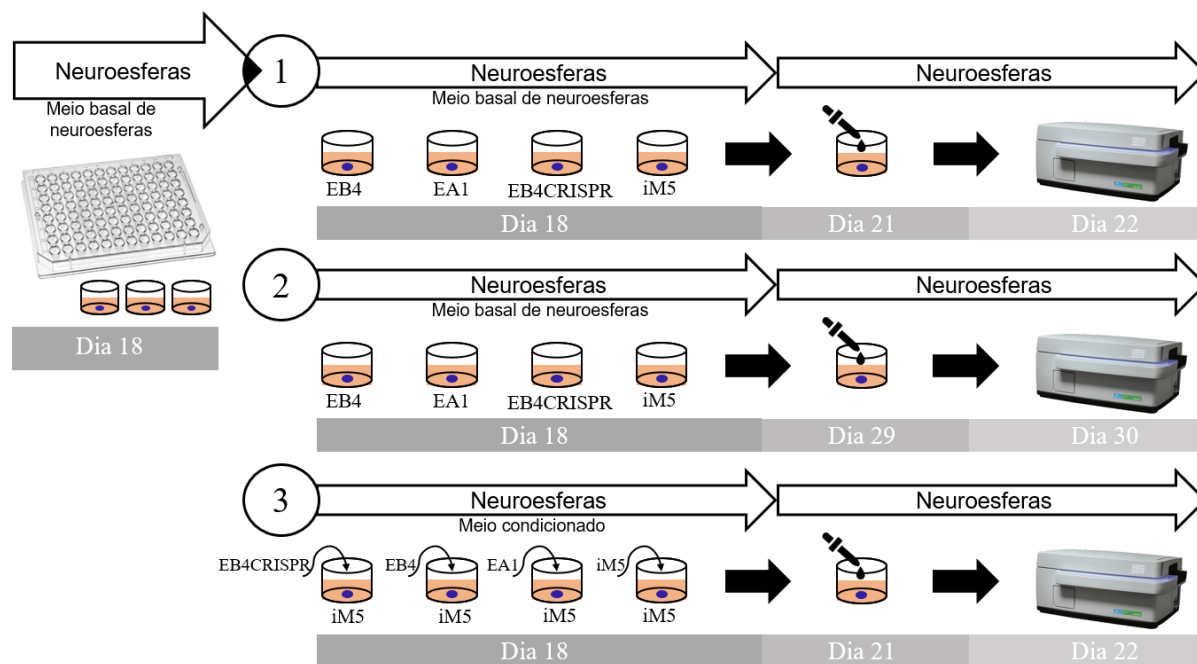
No dia 18 do protocolo, 10 dias após as neuroesferas ficarem sob rotação de 90 rpm no *Spinner Flask*, a análise da migração neuronal pôde ser realizada. Nesse momento, cada neuroesfera foi separadamente plaqueada em um poço de uma placa de 96, que já havia sido preparado com PLO-Laminina, necessária para adesão das neuroesferas no poço.

A partir desse momento, seguiram-se três linhas metodológicas diferentes. Na primeira, utilizou-se o meio basal de neuroesferas e elas foram deixadas crescer nos poços por 3 dias, sem nenhuma troca de meio. Na segunda linha metodológica, fez-se uso do mesmo meio, porém o corte temporal para análise foi de 11 dias, com troca de 50% do meio a cada 2-3 dias. Todos os quatro tipos celulares passaram por esses experimentos. Na terceira abordagem metodológica, utilizou-se apenas os clones iM5 em um cenário de meio condicionado (50% de meio basal para neuroesferas e 50% de meio recolhido das neuroesferas EB4, EA1, EB4CRISPR e iM5 previamente geradas). As neuroesferas iM5 foram deixadas crescer por 3 dias nesse meio condicionado, sem nenhuma troca de meio.

No fim do tempo determinado para cada experimento, o meio de cada poço de 96 com as neuroesferas foi retirado e as elas foram fixadas com PFA 4% por 20 minutos. Após isso, os poços foram lavados com PBS 1x por três vezes e colocados em contato com Triton 0,1% por 10 minutos, sucedendo-se com mais três lavagens com PBS 1x. Enfim, os poços foram incubados com BSA 5% por uma hora e então foram colocados em contato com o anticorpo primário (TUBB3 TUJ1) *overnight*. No dia seguinte, os poços foram lavados com Tween 0,05% por duas vezes, esperando 5 minutos em cada lavagem, e com PBS 1x por três vezes. O

anticorpo secundário (anti-mouse IgG AF488) foi então colocado em contato com os poços por 40 minutos e eles foram lavados posteriormente com Tween 0,05% e PBS 1x por duas vezes cada. Os núcleos foram marcados com Hoechst no final do processo. As imagens foram lidas pelo Operetta HCS (PerkinElmer). Um resumo dessa técnica está evidenciado na figura 11.

Figura 11 - Fluxo de análise por imunofluorescência das neuroesferas. No dia 18, as neuroesferas plaqueadas para a imunofluorescência foram divididas em três grupos. Nos grupos 1 e 2, as neuroesferas dos tipos celulares EB4, EB4CRISPR, EA1 e iM5 foram individualmente plaqueadas em poços de 96, sendo utilizado o meio basal para neuroesferas (MBN). O grupo 1 foi fixado em PFA 4% três dias após o plaqueamento e o grupo 2, onze dias após. A imunofluorescência foi então realizada e os dados foram analisados no Operetta HCS (PerkinElmer) um dia após a fixação. No grupo 3, apenas as neuroesferas do tipo célula iM5 foram plaqueadas nos poços de 96, utilizando-se, contudo, um meio condicionado. Esse meio é composto de 50% de MBN e 50% de meio recolhido das neuroesferas EB4, EA1, EB4CRISPR e iM5 previamente geradas. Assim, o grupo 3 foi subdividido em mais 4 subgrupos, o subgrupo 3.1 recebeu o meio condicionado constituído de MBN e meio recolhido das neuroesferas EB4CRISPR, o subgrupo 3.2 de MBN e meio recolhido das neuroesferas EB4, o subgrupo 3.3 de MBN e meio recolhido das neuroesferas EA1 e, por fim, o subgrupo 3.4 foi plaqueado com um meio condicionado feito de MBN e meio recolhido das neuroesferas iM5. As neuroesferas dos quatro subgrupos foram fixadas com PFA 4% três dias após o plaqueamento e analisadas no Operetta HCS (PerkinElmer) no dia seguinte a fixação, após a imunofluorescência.



Fonte: Próprio autor.

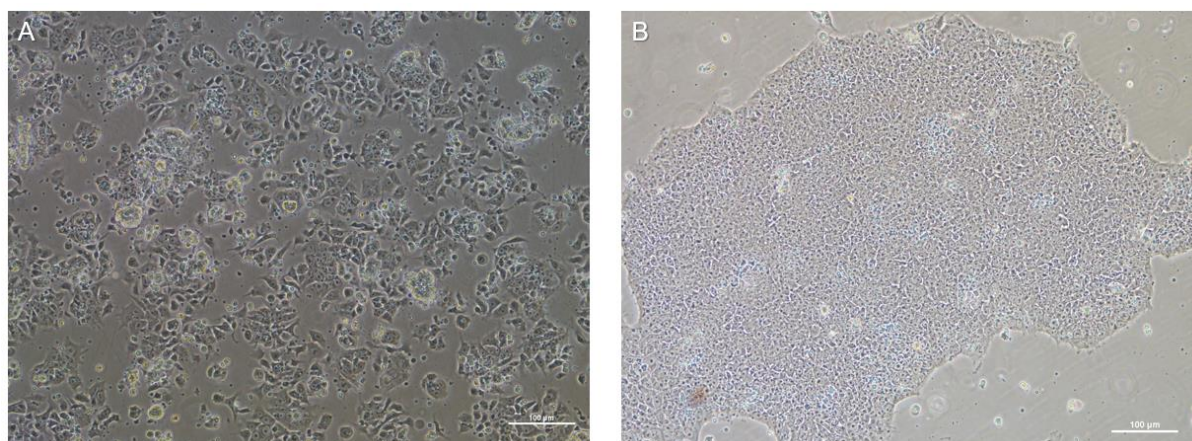
4.12 Análise estatística

As imagens foram adquiridas tanto no Operetta HCS (PerkinElmer) quanto em um microscópio confocal A1+ (Nikon), para fins de quantificação, foram utilizados o sistema de *High Content Screening Operetta* (Perkin Elmer), software Harmony e o programa *Graph Pad Prim*. As análises foram realizadas utilizando o teste One-way ANOVA com pós-teste de Tukey para múltiplas comparações. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

5 RESULTADOS

Primeiramente, foi realizado o descongelamento dos *vials* das linhagens de iPSCs: EB4 (doador saudável), EA1 (doador saudável), EB4CRISPR (*knockout* para o gene *SCN2A*, derivada da EB4 após modificação genética) e iM5 (paciente autista com mutação no gene *SCN2A*). Após o descongelamento, todas as colônias apresentavam morfologia similar a evidenciada na figura 12A, que expressa o descongelamento do clone EB4. No dia 2 do protocolo, antes da realização da passagem, a morfologia dos clones foi novamente analisada (figura 12B). As quatro linhagens celulares, obtidas dos três indivíduos, apresentaram conformação iPSCs típica com células redondas, com núcleo bem marcado, pouco citoplasma, baixa razão núcleo-citoplasma, um nucléolo evidente e com crescimento em colônia. Além disso, as colônias apresentavam-se compactas, com bordas patentes e bem marcadas, típicas de iPSCs.

Figura 12 - Imagens de campo claro das células iPSCs EB4 após descongelamento. **(A)** Clone EB4 após o descongelamento com sua morfologia típica, em um aumento de 10x. **(B)** Clone EB4 no dia 2 do protocolo em um aumento em 10x.

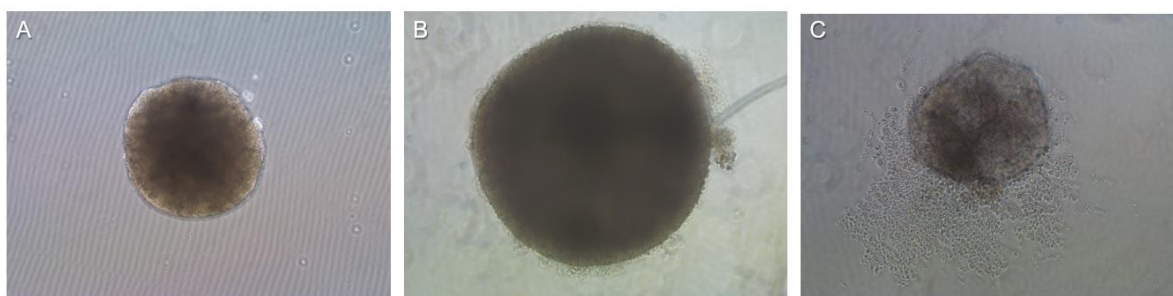


Fonte: Próprio autor.

No dia 4, os corpos embrioides (EBs) foram formados em uma placa de 96, ficando até o dia 10 nesse ambiente. No dia 7 uma foto em campo claro foi tirada dos corpos embrioides de EB4, EA1 e iM5 (figura 13). É notável que as estruturas de EB4 e EA1 tinham morfologia típica de corpos embrioides, com disposição espacial semelhante a esfera e densidade uniforme (figura 13A e 13B). Contudo, o mesmo não é observado com o EB de iM5, ele apresenta, além de um menor tamanho, densidades variáveis em seu interior e muita morte celular, demonstrada pela grande quantidade de células ao redor do EB, que se dissociaram do mesmo (figura 13C). Por todos esses fatores, é possível destacar que a linhagem iM5, mais importante para a

realização desse trabalho, não foi gerada em um bom nível de qualidade. Os EBs desse clone se apresentaram tão dimórficos que tiveram que ser descartados, nem chegando a se tornar organoides, que é quando ocorre um maior nível de regionalização neuronal das estruturas.

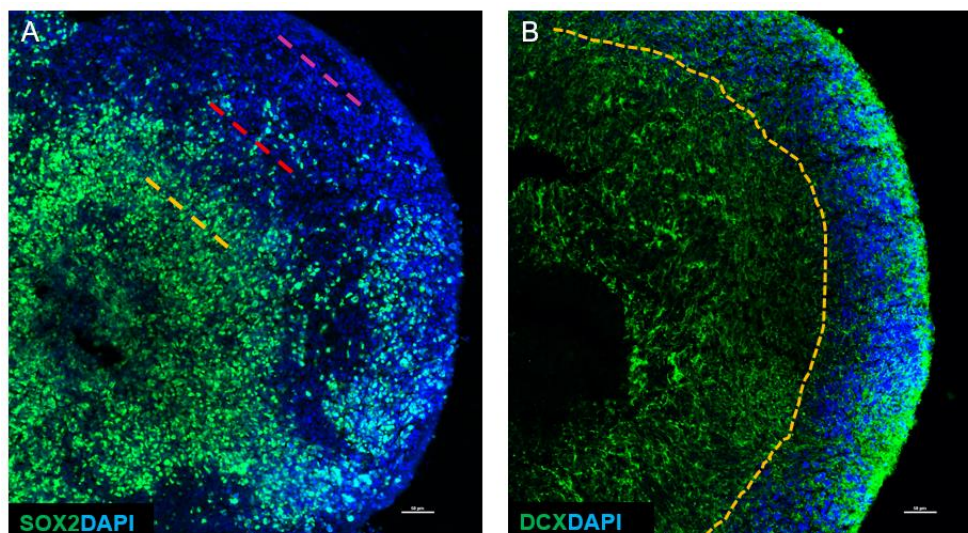
Figura 13 - Imagem de campo claro dos corpos embrioides (EBs) no dia 7 do protocolo, na placa de 96 com fundo em U não aderente. (A) Corpo embriode de EB4. (B) EB de EA1. (C) EB de iM5, demonstrando morfologia atípica e muita morte celular ao redor da estrutura. Aumento de 10x.



Fonte: Próprio autor.

Apesar disso, para provar que o protocolo gerado é eficaz para a formação de organoides cerebrais de outros clones, foi feita uma imunofluorescência com o clone EA1. Cinco semanas após esses organoides serem passados para o *Spinner Flask* a técnica foi realizada e o resultado foi visto na microscopia confocal (figura 14). É possível discernir três áreas nos organoides, a primeira delas, mais central, tem marcação bastante positiva para SOX2, o que indica uma presença acentuada de células tronco neuronais. A segunda, tem marcação intermediária desse anticorpo e a terceira, mais externa, praticamente não o marca (figura 14A). Também foi realizada a imunofluorescência com o anticorpo DCX, que indica a presença de neurônios imaturos, presentes mais ao centro do organoide (figura 14B).

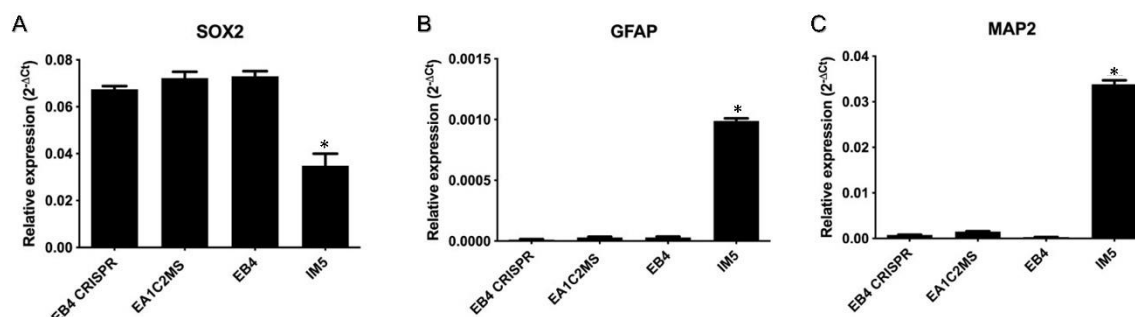
Figura 14 - Caracterização por imunofluorescência dos organoides cerebrais gerados a partir das células EA1. Através da microscopia confocal foi possível observar a presença de marcadores de células tronco pluripotentes. **(A)** Destaque para a segmentação estrutural clássica de organoides cerebrais, mais ao centro (linha amarela) temos forte marcação de SOX2, seguida por uma região de marcação intermediária (linha vermelha), para por fim, na região mais externa, ser possível observar baixíssima presença desse marcador (linha rosa). **(B)** Outro corte de um organoide cerebral demonstrando a presença de neurônios imaturos (DCX^+) mais ao centro da estrutura (linha amarela).



Fonte: Próprio autor.

Por razão das células iM5 não se desenvolverem em organoides adequadamente, foi necessário mudar a metodologia para um cultivo neuronal em 3D utilizando agora as células tronco neuronais (NSC) e as neuroesferas. No dia 0 do protocolo de formação de neuroesferas essas células foram descongeladas do biorrepositório do Hospital São Rafael e expandidas. Nesse momento, foram realizados alguns testes a fim de saber se os clones de NSC EB4, EA1, EB4CRISPR e iM5 eram comparáveis entre si. O PCR *real time* (gráfico 1) indica que todos os clones são realmente células tronco neuronais, evidenciado pela amplificação acentuada de SOX2 (gráfico 1A). Entretanto, mostra também que as células iM5 possuem um grau maior de diferenciação que as demais, pela menor amplificação de SOX2 (gráfico 1A) e maior de GFAP, marcador de astrócitos (gráfico 1B) e de MAP2, marcador de neurônios (gráfico 1C).

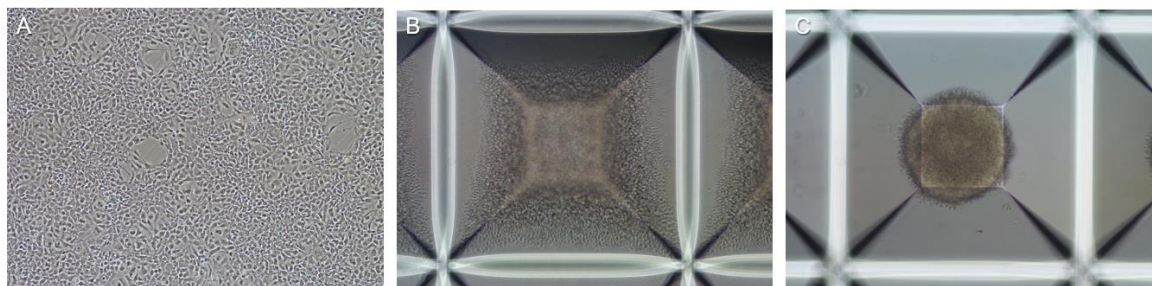
Gráfico 1 - Análise das NSC pela PCR *real time*. **(A)** O primer marcador de células tronco neuronais, SOX2, está mais presente nas NSC EB4, EA1 e EB4CRISPR do que nos clones de iM5. **(B)** O GFAP, primer marcador de astrócitos, está mais presente nas células iM5. **(C)** O primer marcador de neurônio, MAP2, também está mais presente nas células iM5. Isso indica que os clones de iM5, apesar de ainda serem células tronco neuronais, estão em um maior grau de diferenciação do que os demais clones. * $p < 0,05$.



Fonte: Próprio autor.

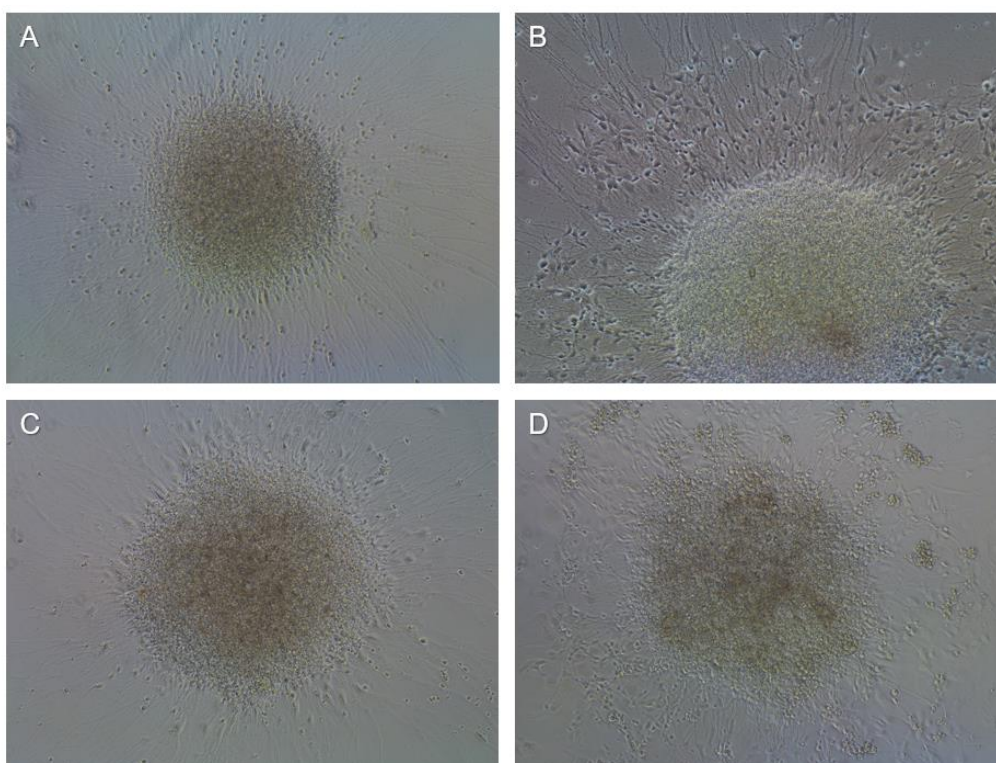
A estrutura das células também foi analisada e a figura 15A evidência um poço de NSC com confluência de cerca de 95% e com células com boa morfologia, havia pouca diferença morfológica entre os quatro clones estudados. No dia 6 do protocolo, essas células foram passadas, colocadas em um poço de uma placa de AggreWell e centrifugadas (figura 15B). Após dois dias no poço, a neuroesfera é formada (figura 15C) e está pronta para dar continuidade ao procedimento. No dia 21 do protocolo, três dias após a passagem das neuroesferas para a placa de 96, uma fotografia em campo claro delas foi tirada (figura 16). É possível verificar que os clones EB4, EA1 e EB4CRISPR emitem maiores prolongamentos neuronais do que o clone iM5. Além disso, a morfologia deste último é atípica em comparação com os demais. No dia 21, também foi feita a imunofluorescência dessas neuroesferas (figura 17). Nota-se a presença e longos prolongamentos axônais nos clones EB4, EA1 e EB4CRISPR (TUJ1⁺) e a existências de diversos núcleos celulares da fora da neuroesfera EA1 (figuras 17A, 17B e 17C). A neuroesfera iM5, contudo, tinha seus prolongamentos visivelmente menores e mais espaços (figura 17D).

Figura 15 - Imagens de campo claro das células NSC EB4. **(A)** Clone EB4 em cultura. **(B)** Células EB4 no micropoço de uma placa de AggreWell no dia 6 do protocolo de formação de neuroesferas, após a centrifugação. **(C)** Neuroesfera EB4 formada dentro do micropoço de AggreWell no dia 8 do protocolo. Aumento de 10x.



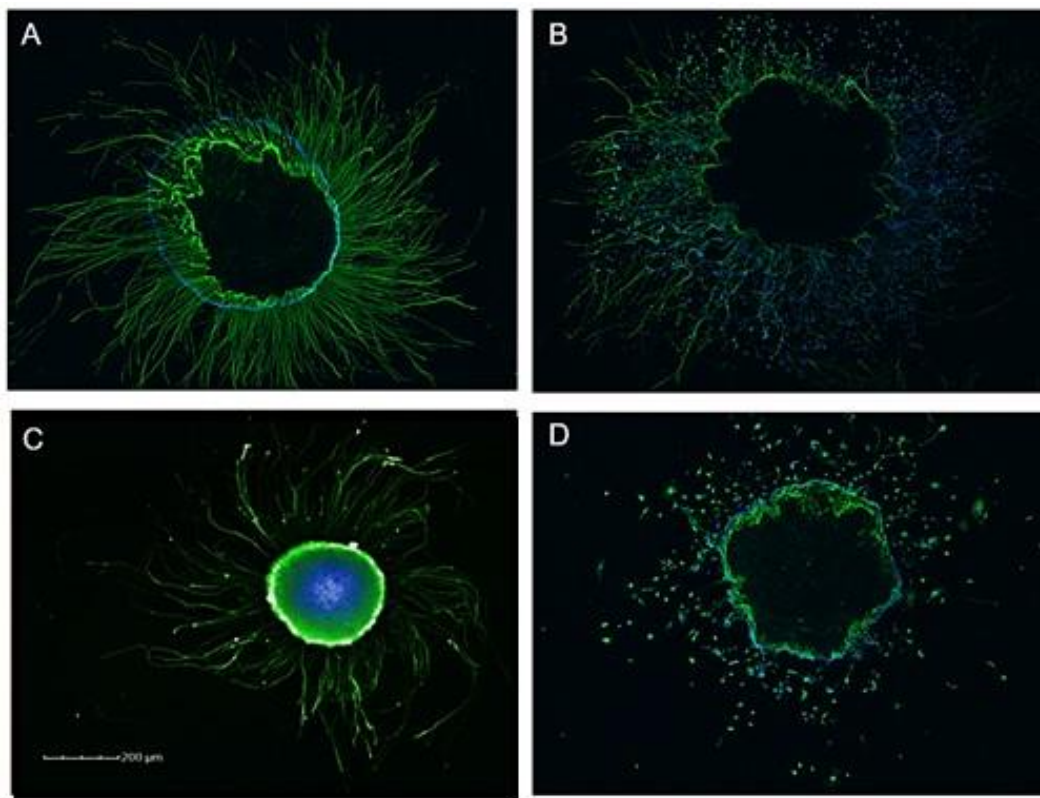
Fonte: Próprio autor.

Figura 16 - Imagem de campo claro das neuroesferas no dia 21 do protocolo. **(A)** Neuroesfera EB4. **(B)** Neuroesfera EA1. **(C)** Neuroesfera EB4CRISPR. **(D)** Neuroesfera iM5. Aumento de 10x.



Fonte: Próprio autor.

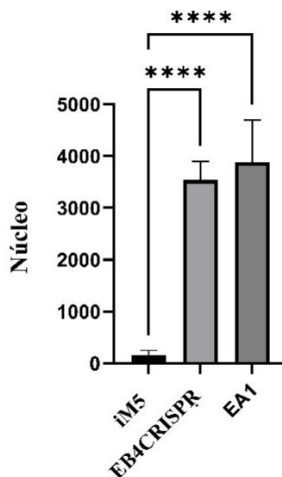
Figura 17 - Análise por imunofluorescência das neuroesferas. Por meio da análise através do Operetta HCS (PerkinElmer) foi possível verificar a presença de prolongamentos neuronais (TUJ1⁺) em verde. **(A)** Neuroesfera EB4 emitindo longos prolongamentos axonais. **(B)** Neuroesfera EA1 e seus prolongamentos, destaca-se aqui, contudo, a presença de uma série de núcleos de neurônios, evidenciado pela marcação com DAPI, fora da neuroesfera. **(C)** Neuroesfera EB4CRISPR apresentando migração e morfologia típicas. **(D)** Neuroesfera iM5, nota-se aqui uma emissão substancialmente menor de prolongamentos comparando-se com as neuroesferas geradas por outros clones.



Fonte: Próprio autor.

Os dados obtidos pela imunofluorescência foram avaliados estatisticamente e confirmaram que a neuroesfera de iM5 emitiu menos núcleos através do poço em comparação com as neuroesferas de EA1 e de EB4CRISPR (gráfico 2). A emissão de núcleos através do poço é um dos parâmetros utilizados para avaliar o crescimento da neuroesfera, já que quando elas vão se desenvolvendo acabam por emitir axônios e núcleos para fora do centro da estrutura. Assim, é possível afirmar que o clone iM5 se desenvolveu menos do que seus pares, incluindo EB4CRISPR, que é *knowout* para o gene *SCN2A* ($p < 0,001$). É interessante destacar também que não houve diferença estatisticamente significativa entre EB4CRISPR e EA1.

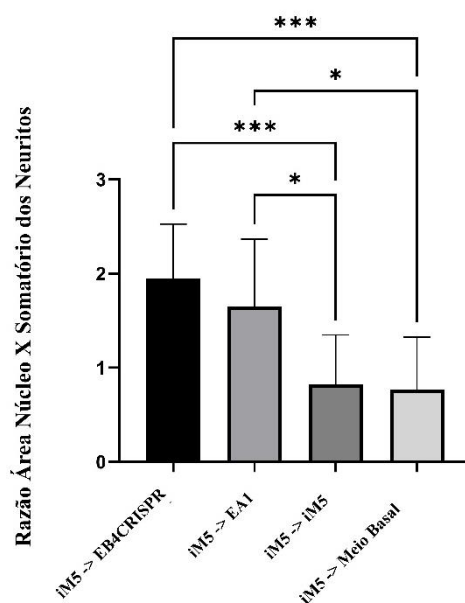
Gráfico 2 - Migração dos núcleos das neuroesferas pelo poço. Esse gráfico foi gerado através dos dados obtidos pela imunofluorescência, feita no dia 21 do protocolo, das neuroesferas. É possível verificar aqui que a migração celular, avaliada pela presença de núcleos de neurônios fora da neuroesfera, é substancialmente maior nos clones EB4CRISPR e EA1 em relação ao iM5. Tal fato expressa que, a despeito do *knockout* do gene *SCN2A* realizado na EB4CRISPR, ela tem crescimento maior que a iM5. **** $p < 0,001$.



Fonte: Próprio autor.

A última análise estatística foi realizada através do experimento de meio condicionado, que consistiu em deixar as neuroesferas de iM5 crescerem por 3 dias em um meio formado por 50% de meio basal para neuroesferas e 50% de meio recolhido das neuroesferas EB4, EA1, EB4CRISPR e iM5 previamente geradas. O gráfico 3 indica uma razão entre a área do núcleo e área do axônio da neuroesfera iM5 que expressa um dado de crescimento pela emissão de prolongamentos neuronais. As neuroesferas iM5 em contato com o meio condicionado de EB4CRISPR (iM5=>EB4CRISPR) tiveram um crescimento estatisticamente mais significativo ($p < 0,001$) quando comparadas com as iM5=>iM5 e com as iM5=>meio basal para neuroesferas. Além disso, o crescimento de iM5=>EA1 foi estatisticamente maior ($p < 0,05$) quando comparadas com iM5=>iM5 e com as iM5=>meio basal para neuroesferas. Outro dado importante é que não ocorreu diferença estatística no crescimento entre as iM5 em contato com o meio basal e as com o meio de iM5, nem entre os grupos iM5=>EB4CRISPR e iM5=>EA1.

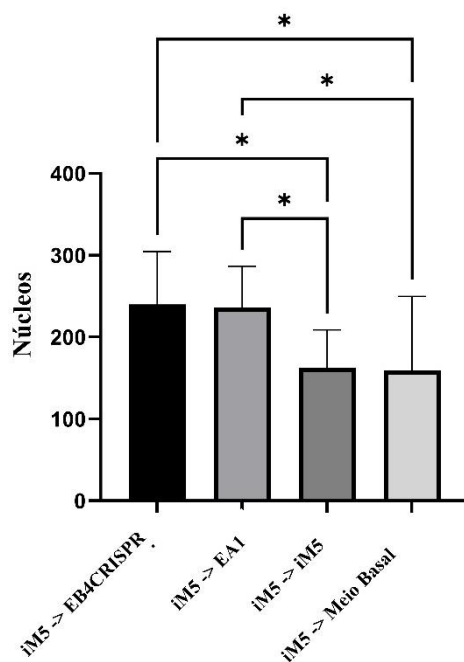
Gráfico 3 - Razão entre a área do núcleo e área do axônio da neuroesfera iM5 com diferentes meios condicionados. Esse gráfico foi gerado através dos dados obtidos pela imunofluorescência, feita no dia 21 do protocolo, da neuroesfera iM5. É notável que existe diferença estatística entre o crescimento da neuroesfera iM5 com meio condicionado da EB4CRIPR e da iM5 usando o meio condicionado de iM5 e o meio basal. O mesmo ocorre entre as iM5 usando o meio condicionado de EA1, que cresceu mais, em relação as iM5 em contato com o meio condicionado de iM5 e com o meio basal. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.



Fonte: Próprio autor.

Por fim, realizando a análise estatística da migração de núcleo através do poço, no mesmo ensaio de meio condicionado, temos que as $iM5 \Rightarrow EA1$ e $iM5 \Rightarrow EB4CRIPR$ migraram mais que as $iM5 \Rightarrow iM5$ e as que $iM5 \Rightarrow$ meio basal para neuroesferas ($p < 0,05$). É também importante destacar que não ocorreu diferença estatisticamente significava entre os clones $iM5 \Rightarrow EA1$ e $iM5 \Rightarrow EB4CRIPR$, nem entre os clones $iM5 \Rightarrow iM5$ e as que $iM5 \Rightarrow$ meio basal para neuroesferas. Os dados dessa análise estão evidenciados no gráfico 4.

Gráfico 4 - Migração dos núcleos da neuroesfera iM5 pelo poço com diferentes meios condicionados. Esse gráfico foi gerado através dos dados obtidos pela imunofluorescência, feita no dia 21 do protocolo, da neuroesfera iM5. É possível verificar que não existe diferença estatística significativa entre as neuroesferas iM5 usando o meio condicionado de EB4CRISPR e EA1. Fato similar ocorre entre as neuroesferas iM5 usando o meio condicionado de iM5 e o meio basal para neuroesferas. Porém, as neuroesferas do primeiro grupo migraram mais pela placa do que as do segundo grupo. Isso demonstra que possivelmente algum componente no meio das neuroesferas EB4CRISPR e EA1 influencia na migração neuronal. * $p < 0,05$.



Fonte: Próprio autor.

6 DISCUSSÃO

As iPSCs EA1, EB4, EB4CRISPR e iM5 foram geradas previamente a esse trabalho, assim como os dados de análise sobre sua pluripotência. É importante destacar que não foram encontradas quaisquer alterações estatisticamente significativas nos marcadores de pluripotência entre as células, i.e., elas tinham características similares nesse estágio de desenvolvimento^{9,71}. É possível verificar na figura 12, uma morfologia iPSC típica que estava presente em todos os clones abordados nesse trabalho. Contudo, artigos recentes têm demonstrado diferenças importantes na cultura de células advindas de controles saudáveis e de pacientes autistas. Grunwald *et al.* fez, em 2019, diversas análises em células iPSC e concluiu que as células advindas de pacientes autistas possuíam uma reduzida capacidade de diferenciação cortical em comparação com os controles. Ademais, elas tinham uma ligeira diminuição nas amplitudes de pico de sinais de sódio⁷². Assim, é notável que apesar das iPSCs usadas nesse estudo não tivessem diferenças nos marcadores de pluripotência, elas provavelmente possuíam importantes distinções em outros parâmetros que não foram previamente analisados, o que explica, de certa forma, a diferenciação assimétrica vista nos grupos controle e autista.

A primeira diferenciação neuronal realizada foi se utilizando os organoides cerebrais. É evidente na figura 13 diferenças importantes entre os organoides advindos de EB4, EA1 e iM5, na qual esse último possui um acentuado dismorfismo e morte celular em comparação com os demais. Isso denota uma certa dificuldade em efetuar a diferenciação das iPSCs em neurônios e células da glia e existem três principais hipóteses para tal constatação: 1) o protocolo de diferenciação está inadequado; 2) as células iM5 não se desenvolvem em organoides por motivos intrínsecos e 3) o genótipo do TEA, presente nas células iM5, impedem as mesmas de se diferenciar. Para provar que o protocolo gerado era eficaz, organoides cerebrais de EA1 (controle saudável) foram formados e analisados na imunofluorescência (figura 14). Uma morfologia típica, já evidenciada largamente na literatura¹², foi encontrada: é notável um bom nível de regionalização, ou seja, separação em áreas, típica dos organoides, onde a parte mais central contém células tronco (zona ventricular proliferativa) que, à medida em que vão se diferenciando, migram para a área mais externa da composição (placa cortical).

Excluindo-se a primeira hipótese, restam duas. É sabido que alguns tipos celulares não se desenvolvem em organoides cerebrais de maneira adequada por razões intrínsecas, ou seja, mesmo com uma técnica correta as células não se organizam o suficiente para formar essa

complexa estrutura em 3D. Os motivos para isso ainda são desconhecidos, porém provavelmente estão relacionados a aspectos da cultura ou mesmo genéticos do próprio paciente que gerou essa célula. Outra hipótese possível, é que as mutações relacionadas ao TEA, que o paciente que deu origem as células iM5 tem, impossibilitem elas de se diferenciarem em organoides cerebrais. Considerando todos os fatores de confusão aqui elencados, se essa última hipótese se confirmar um dado clínico importante pode ser gerado. Seria possível supor que as mutações presentes nesse indivíduo alteraram tanto as vias intracelulares de comunicação que tornaram impossível o desenvolvimento adequado de estruturas milhões de vezes mais simples que o cérebro, os organoides. Assim sendo, tornar-se-ia mais claro o porquê do neurodesenvolvimento inadequado desse sujeito.

No entanto, é importante destacar que organoides cerebrais advindos de pacientes autistas já foram amplamente gerados na literatura, como no trabalho de Chan e colaboradores (2020) em que foi mostrado uma neurogênese e um crescimento anormal no córtex cerebral, defeitos na migração e uma sinaptogênese inadequada nos organoides advindos de pacientes com TEA⁷³. Assim sendo, a principal razão levantada por esse estudo para o não desenvolvimento dos organoides de iM5 são os aspectos intrínsecos genéticos, assim como possíveis problemas de cultura ou mesmo uma associação das três hipóteses acima elencadas.

Como não foi possível a geração de organoides cerebrais de iM5, outro modelo de diferenciação em 3D precisou ser executado. O primeiro passo para isso foi a diferenciação das iPSCs (EA1, EB4, EB4CRISPR e iM5) em NSC, com posterior análise por PCR *real time* (gráfico 1). É possível notar uma amplificação estatisticamente menor de SOX2 (marcador de NSC) nas células iM5, enquanto ocorre uma amplificação estatisticamente maior de GFAP (marcador de astrócitos) e MAP2 (marcador de neurônio) nessas células em comparação com os controles (EA1 e EB4CRISPR). Isso expressa um maior grau de diferenciação das células iM5 em relação as demais, contudo, devido à alta sensibilidade da técnica utilizada, ainda não é possível afirmar se esses dados implicam em algo na prática. Fato é que o PCR *real time* validou todos os tipos celulares como NSC verdadeiras, tornando-os comparáveis entre si e permitindo a geração de neuroesferas a partir dessas estruturas.

As neuroesferas geradas podem ser vistas na figura 16 (microscopia de campo claro) e 17 (imunofluorescência), nelas já é possível notar um grau de dismorfismo nas neuroesferas de iM5 assim como uma reduzida expressão de prolongamentos axonais e núcleos através do poço, dois importantes parâmetros de crescimento dessas estruturas. Contudo, diferente dos

organoides cerebrais, as neuroesferas de iM5 foram geradas até o estágio final do seu desenvolvimento, permitindo assim a análise. As diferenças evidenciadas nas figuras 16 e 17 são alterações fenotípicas que provavelmente expressam os distintos *pools* genéticos dos indivíduos que geraram essas neuroesferas, em especial de iM5, que possui variadas mutações que aumentam o risco para o desenvolvimento do TEA.

Os dados obtidos pela imunofluorescência foram avaliados e confirmaram uma interessante observação: apesar do *knockout* do gene *SCN2A* feito nas células EB4CRISPR elas continuavam migrando e crescendo mais do que as células iM5, que tinham mutação em heterozigose para o gene *SCN2A* (gráfico 2). É destacável inclusive que as neuroesferas de EB4CRISPR migraram de maneira similar as neuroesferas de EA1, não havendo diferença estatística entre elas.

Assim, analisando o exoma do paciente que gerou a linhagem iM5, foi observado que ele possuía mutação não apenas no gene *SCN2A*, como também em diversos outros, como o gene *RELN* (Apêndice F). Logo, é possível supor com esses dados experimentais que o gene *SCN2A* não está relacionado com a migração celular na organogênese neuronal, pois o clone EB4CRISPR migrou em padrões normais. Contudo, alguma outra mutação presente nas células iM5 fizeram com que as suas neuroesferas migrassem bem menos que o habitual.

A principal suspeita era a mutação em heterozigose do gene *RELN* presente nas iM5. Sabendo que esse gene, quando funcionante, é transcrito e traduzido na proteína relina, que é secretada para o meio extracelular⁸, um ensaio com meio condicionado foi realizado. O gráfico 3 indica a razão entre a área do núcleo e área do axônio da neuroesfera iM5 que expressa um dado de crescimento pela emissão de prolongamentos neuronais. Já o gráfico 4 demonstra outro importante parâmetro de crescimento, a emissão de núcleos pelo poço. Nas duas análises o mesmo dado foi encontrado, as células iM5 em contato com o meio condicionado de EA1 e de EB4 migrou mais em comparação com os controles (iM5 em contato com o meio condicionado de iM5 e em contato com o meio basal).

Assim, pode-se supor que as células EA1 e EB4CRISPR, sem mutação no gene *RELN*, secretam normalmente relina no meio extracelular e esse meio, quando colocado em contato com a neuroesfera de iM5, fez essas crescerem e migram mais. Portanto, isso corrobora com a hipótese inicial que o gene *RELN* está relacionado com o crescimento e migração neuronal, enquanto o *SCN2A* não, visto que as neuroesferas iM5=>EB4CRISPR também migraram mais.

Contudo, esse aumento no crescimento das neuroesferas iM5, provavelmente promovido pela relina presente no meio condicionado extracelular, é parcial e não reestabelece

o crescimento normal. Comparando-se os gráficos 2 e 4 é possível verificar que a migração regular seria algo em torno de 3.500 a 4.000 núcleos pelo poço, como é evidenciado nas neuroesferas EA1 e EB4CRISPR, sem mutação no gene *RELN*. As neuroesferas de iM5 em contato com o meio condicionado de EA1 e EB4CRISPR migram cerca de 250 núcleos no poço, valor baixo em comparação com a normalidade mais estatisticamente maior em comparação com as de iM5 em contato com o meio condicionado de iM5 e em contato com o meio basal.

Essa recuperação parcial é provavelmente multifatorial, a relina no meio condicionado utilizado pode estar presente em baixas quantidades ou já ter sido em grande parte degradada, por exemplo. Ou ainda, outras mutações presentes no genoma de iM5 podem estar influenciando a migração neuronal. Fato é que as neuroesferas de iM5, com mutação no gene *RELN*, migraram menos em comparação aos controles e esse fenótipo foi parcialmente revertido quando elas foram colocadas em contato com o meio condicionado, indicando uma possível relação entre esse gene e a migração neuronal.

Logo, a hipótese trazida por esse trabalho é a de que o gene *SCN2A* não tem um papel principal na migração neuronal, sendo o gene *RELN* o mais provável de estar relacionado à migração e crescimento neuronal.

7 CONCLUSÕES

Por meio desse projeto foi possível estabelecer protocolos eficazes para o estudo das variantes gênicas de risco para o autismo, tanto por meio da formação de organoides cerebrais quanto de neuroesferas. Através desse último, por conseguinte, foram geradas linhagens comparáveis de neuroesferas advindas de paciente autista, doador saudável e *knockout* para o gene SCN2A. Tudo isso possibilitou o estudo fisiopatológico do transtorno do espectro autista e forneceu informações valiosas sobre as influências genéticas dessa prevalente síndrome. Mais experimentos e análises, no entanto, precisam ser feitos para validar ou não os resultados obtidos até então. Por fim, para que se adquira uma compreensão abrangente da fisiopatologia e da etiologia da doença outras pesquisas devem ser realizadas, se tornando, possivelmente, mais fácil a descoberta de um fármaco eficaz para o TEA.

REFERÊNCIAS

1. Kanner L. Autistic Disturbances of Affective Contact. *Nerv Child*. 1943;2:217-250.
2. Sena T. *Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais - DSM-5, Estatísticas e Ciências Humanas: Inflexões Sobre Normalizações e Normatizações*. Vol 11.; 2014. doi:10.5007/interthesis.v11i2.34753
3. Lord C, Brugha TS, Charman T, et al. Autism spectrum disorder. *Nat Rev Dis Prim*. 2020;6(1). doi:10.1038/s41572-019-0138-4
4. Gomes PTM, Lima LHL, Bueno MKG, Araújo LA, Souza NM. Autism in Brazil: a systematic review of family challenges and coping strategies. *J Pediatr (Versão em Port)*. 2015;91(2):111-121. doi:10.1016/j.jpedp.2015.01.005
5. Constantino JN, Marrus N. The Early Origins of Autism. *Child Adolesc Psychiatr Clin N Am*. 2017;26(3):555-570. doi:10.1016/j.chc.2017.02.008
6. Betancur C. Etiological heterogeneity in autism spectrum disorders: More than 100 genetic and genomic disorders and still counting. *Brain Res*. 2011;1380:42-77. doi:10.1016/j.brainres.2010.11.078
7. Kaczmarek LK. Loss of NaV1.2-Dependent Backpropagating Action Potentials in Dendrites Contributes to Autism and Intellectual Disability. *Neuron*. 2019;103(4):551-553. doi:10.1016/j.neuron.2019.07.032
8. Ishii K, Kubo KI, Nakajima K. Reelin and neuropsychiatric disorders. *Front Cell Neurosci*. 2016;10(OCT2016):1-13. doi:10.3389/fncel.2016.00229
9. Gabriela Louise de Almeida Sampaio. GERAÇÃO DE LINHAGENS DE CÉLULAS-TRONCO PLURIPOTENTES INDUZIDAS COM ALTERAÇÃO NO GENE SCN2A E ORGANOIDES CEREBRAIS COMO FERRAMENTAS PARA ESTUDO DO AUTISMO. Publicado online 2019.
10. Ben-Shalom R, Keeshen CM, Berrios KN, An JY, Sanders SJ, Bender KJ. Opposing Effects on NaV1.2 Function Underlie Differences Between SCN2A Variants Observed in Individuals With Autism Spectrum Disorder or Infantile Seizures. *Biol Psychiatry*. 2017;82(3):224-232. doi:10.1016/j.biopsych.2017.01.009
11. Hong H, Takahashi K, Ichisaka T, et al. Suppression of induced pluripotent stem cell generation by the p53-p21 pathway. *Nature*. 2009;460(7259):1132-1135. doi:10.1038/nature08235
12. Lancaster MA, Knoblich JA. Generation of cerebral organoids from human pluripotent stem cells. *Nat Protoc*. 2014;9(10):2329-2340. doi:10.1038/nprot.2014.158
13. Technologies L. Induction of Neural Stem Cells from Human Pluripotent Stem Cells Using PSC Neural Induction Medium (MAN0008031 Rev A.0). 2015;(1256521). www.lifetechnologies.com/support.
14. Lancaster MA, Renner M, Martin CA, et al. Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature*. 2013;501(7467):373-379. doi:10.1038/nature12517

15. Maenner MJ, Shaw KA, Baio J, et al. Prevalence of autism spectrum disorder among children aged 8 Years-Autism and developmental disabilities monitoring network, 11 Sites, United States, 2016. *MMWR Surveill Summ.* 2020;69(4):1-12. doi:10.15585/MMWR.SS6904A1
16. Treffert DA. Epidemiology of Infantile Autism. *Arch Gen Psychiatry.* 1970;22(5):431-438. doi:10.1001/archpsyc.1970.01740290047006
17. Aydos V. AGÊNCIA E SUBJETIVAÇÃO NA GESTÃO DE PESSOAS COM DEFICIÊNCIA: A INCLUSÃO NO MERCADO DE TRABALHO DE UM JOVEM DIAGNOSTICADO COM AUTISMO. :329-358.
18. Andrade GN de, Rezende TMRL, Madeira AMF. Child health booklet: Experiences of professionals in primary health care. *Rev da Esc Enferm.* 2014;48(5):854-860. doi:10.1590/S0080-623420140000500012
19. Dawson G, Jones EJH, Merkle K, et al. Early behavioral intervention is associated with normalized brain activity in young children with autism. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.* 2012;51(11):1150-1159. doi:10.1016/j.jaac.2012.08.018
20. Brookman-Frazee LI, Drahota A, Stadnick N. Training community mental health therapists to deliver a package of evidence-based practice strategies for school-age children with autism spectrum disorders: A pilot study. *J Autism Dev Disord.* 2012;42(8):1651-1661. doi:10.1007/s10803-011-1406-7
21. Silva LS da, Furtado LAR. O sujeito autista na Rede SUS: (im)possibilidade de cuidado TT - The autistic subject in the Health Unic System: (im)possibility of care. *Fractal Rev Psicol.* 2019;31(2):119-129. doi:10.22409/1984-0292/v31i2/5635
22. Dawson G, Rogers S, Munson J, et al. Randomized, controlled trial of an intervention for toddlers with autism: The early start Denver model. *Pediatrics.* 2010;125(1). doi:10.1542/peds.2009-0958
23. Kim JY, Son MJ, Son CY, et al. Environmental risk factors and biomarkers for autism spectrum disorder: an umbrella review of the evidence. *The Lancet Psychiatry.* 2019;6(7):590-600. doi:10.1016/S2215-0366(19)30181-6
24. Bölte S, Girdler S, Marschik PB. The contribution of environmental exposure to the etiology of autism spectrum disorder. *Cell Mol Life Sci.* 2019;76(7):1275-1297. doi:10.1007/s00018-018-2988-4
25. Rossignol DA, Genuis SJ, Frye RE. Environmental toxicants and autism spectrum disorders: A systematic review. *Transl Psychiatry.* 2014;4(2):e360-23. doi:10.1038/tp.2014.4
26. Bilbo SD, Block CL, Bolton JL, Hanamsagar R, Tran PK. Beyond infection - Maternal immune activation by environmental factors, microglial development, and relevance for autism spectrum disorders. *Exp Neurol.* 2018;299:241-251. doi:10.1016/j.expneurol.2017.07.002
27. Modabbernia A, Velthorst E, Reichenberg A. Environmental risk factors for autism: an evidence-based review of systematic reviews and meta-analyses. *Mol Autism.* 2017;8(1):1-16. doi:10.1186/s13229-017-0121-4

28. Keller R, Basta R, Salerno L, Elia M. Autism, epilepsy, and synaptopathies: a not rare association. *Neurol Sci.* 2017;38(8):1353-1361. doi:10.1007/s10072-017-2974-x
29. Hulbert SW, Jiang Y hui. Cellular and Circuitry Bases of Autism: Lessons Learned from the Temporospacial Manipulation of Autism Genes in the Brain. *Neurosci Bull.* 2017;33(2):205-218. doi:10.1007/s12264-017-0112-7
30. Sahin M, Sur M. Genes, circuits, and precision therapies for autism and related neurodevelopmental disorders. *Science (80-).* 2015;350(6263):1-14. doi:10.1126/science.aab3897
31. Cohen D, Pichard N, Tordjman S, et al. Specific genetic disorders and autism: Clinical contribution towards their identification. *J Autism Dev Disord.* 2005;35(1):103-116. doi:10.1007/s10803-004-1038-2
32. Sanders SJ, Murtha MT, Gupta AR, et al. De novo mutations revealed by whole-exome sequencing are strongly associated with autism. *Nature.* 2012;485(7397):237-241. doi:10.1038/nature10945
33. Satterstrom FK, Kosmicki JA, Wang J, et al. Large-Scale Exome Sequencing Study Implicates Both Developmental and Functional Changes in the Neurobiology of Autism. *Cell.* 2020;180(3):568-584.e23. doi:10.1016/j.cell.2019.12.036
34. Lammert DB, Howell BW. RELN mutations in autism spectrum disorder. *Front Cell Neurosci.* 2016;10(MAR2016):1-9. doi:10.3389/fncel.2016.00084
35. Weiss LA, Escayg A, Kearney JA, et al. Sodium channels SCN1A, SCN2A and SCN3A in familial autism. *Mol Psychiatry.* 2003;8(2):186-194. doi:10.1038/sj.mp.4001241
36. Silverthorn D et al. *Fisiologia Humana: Uma Abordagem Integrada.*; 2017.
37. Schmunk G, Gargus JJ. Channelopathy pathogenesis in autism spectrum disorders. *Front Genet.* 2013;4(NOV):1-20. doi:10.3389/fgene.2013.00222
38. Spratt PWE, Ben-Shalom R, Keeshen CM, et al. The Autism-Associated Gene Scn2a Contributes to Dendritic Excitability and Synaptic Function in the Prefrontal Cortex. *Neuron.* 2019;103(4):673-685.e5. doi:10.1016/j.neuron.2019.05.037
39. Léna I, Mantegazza M. NaV1.2 haploinsufficiency in Scn2a knock-out mice causes an autistic-like phenotype attenuated with age. *Sci Rep.* 2019;9(1):1-14. doi:10.1038/s41598-019-49392-7
40. Wolff M, Johannesen KM, Hedrich UBS, et al. Genetic and phenotypic heterogeneity suggest therapeutic implications in SCN2A-related disorders. *Brain.* 2017;140(5):1316-1336. doi:10.1093/brain/awx054
41. Sanders SJ, Campbell AJ, Cottrell JR, et al. Progress in Understanding and Treating SCN2A-Mediated Disorders. *Trends Neurosci.* 2018;41(7):442-456. doi:10.1016/j.tins.2018.03.011
42. Bagal SK, Marron BE, Owen RM, Storer RI, Swain NA. Voltage gated sodium channels as drug discovery targets. *Channels.* 2015;9(6):360-366. doi:10.1080/19336950.2015.1079674

43. Sekine K, Kubo KI, Nakajima K. How does Reelin control neuronal migration and layer formation in the developing mammalian neocortex? *Neurosci Res.* 2014;86:50-58. doi:10.1016/j.neures.2014.06.004
44. Mabel S, Disorder AS. Investigação dos efeitos moleculares e celulares de variantes no gene RELN identificadas em um paciente com Transtorno do Espectro Autista Investigação dos efeitos moleculares e celulares de variantes no gene RELN identificadas em um paciente com Transtor. Published online 2017.
45. Zhubi A, Chen Y, Guidotti A, Grayson DR. Epigenetic regulation of RELN and GAD1 in the frontal cortex (FC) of autism spectrum disorder (ASD) subjects. *Int J Dev Neurosci.* 2017;62:63-72. doi:10.1016/j.ijdevneu.2017.02.003
46. Lammert DB, Middleton FA, Pan J, Olson EC, Howell BW. The de novo autism spectrum disorder RELN R2290C mutation reduces Reelin secretion and increases protein disulfide isomerase expression. *J Neurochem.* 2017;142(1):89-102. doi:10.1111/jnc.14045
47. Persico AM, D'agruma L, Maiorano N, et al. Reelin gene alleles and haplotypes as a factor predisposing to autistic disorder. *Mol Psychiatry.* 2001;6(2):150-159. doi:10.1038/sj.mp.4000850
48. Chen N, Bao Y, Xue Y, et al. Meta-analyses of RELN variants in neuropsychiatric disorders. *Behav Brain Res.* 2017;332:110-119. doi:10.1016/j.bbr.2017.05.028
49. Dutta S, Sinha S, Ghosh S, Chatterjee A, Ahmed S, Usha R. Genetic analysis of reelin gene (RELN) SNPs: No association with autism spectrum disorder in the Indian population. *Neurosci Lett.* 2008;441(1):56-60. doi:10.1016/j.neulet.2008.06.022
50. Sánchez-Sánchez SM, Magdalon J, Griesi-Oliveira K, et al. Rare RELN variants affect Reelin–DAB1 signal transduction in autism spectrum disorder. *Hum Mutat.* 2018;39(10):1372-1383. doi:10.1002/humu.23584
51. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell.* 2006;126(4):663-676. doi:10.1016/j.cell.2006.07.024
52. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science (80-).* 2007;318(5858):1917-1920. doi:10.1126/science.1151526
53. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell.* 2007;131(5):861-872. doi:10.1016/j.cell.2007.11.019
54. Yang G, Shcheglovitov A. Probing disrupted neurodevelopment in autism using human stem cell-derived neurons and organoids: An outlook into future diagnostics and drug development. *Dev Dyn.* 2019;(July):1-28. doi:10.1002/dvdy.100
55. Paes BCMF, Moço PD, Pereira CG, et al. Ten years of iPSC: clinical potential and advances in vitro hematopoietic differentiation. *Cell Biol Toxicol.* 2017;33(3):233-250. doi:10.1007/s10565-016-9377-2
56. Lee CT, Bendriem RM, Wu WW, Shen RF. 3D brain Organoids derived from

- pluripotent stem cells: Promising experimental models for brain development and neurodegenerative disorders Julie Y.H. Chan. *J Biomed Sci.* 2017;24(1):1-12. doi:10.1186/s12929-017-0362-8
57. Kelava I, Lancaster MA. Dishing out mini-brains: Current progress and future prospects in brain organoid research. *Dev Biol.* 2016;420(2):199-209. doi:10.1016/j.ydbio.2016.06.037
 58. Renner M, Lancaster MA, Bian S, et al. Self-organized developmental patterning and differentiation in cerebral organoids. *EMBO J.* 2017;36(10). doi:10.15252/embj.201694700
 59. Camp JG, Badsha F, Florio M, et al. Human cerebral organoids recapitulate gene expression programs of fetal neocortex development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112(51). doi:10.1073/pnas.1520760112
 60. Klaus J, Kanton S, Kyrousi C, et al. Altered neuronal migratory trajectories in human cerebral organoids derived from individuals with neuronal heterotopia. *Nat Med.* 2019;25(4):561-568. doi:10.1038/s41591-019-0371-0
 61. Forsberg SL, Ilieva M, Maria Michel T. Epigenetics and cerebral organoids: Promising directions in autism spectrum disorders. *Transl Psychiatry.* 2018;8(1). doi:10.1038/s41398-017-0062-x
 62. Chen HI, Song H, Ming G li. Applications of Human Brain Organoids to Clinical Problems. *Dev Dyn.* 2019;248(1):53-64. doi:10.1002/dvdy.24662
 63. Quadrato G, Brown J, Arlotta P. The promises and challenges of human brain organoids as models of neuropsychiatric disease. *Nat Med.* 2016;22(11):1220-1228. doi:10.1038/nm.4214
 64. Bhaduri A, Andrews MG, Mancía Leon W, et al. Cell stress in cortical organoids impairs molecular subtype specification. *Nature.* 2020;578(7793):142-148. doi:10.1038/s41586-020-1962-0
 65. Shofuda T, Fukusumi H, Kanematsu D, et al. A method for efficiently generating neurospheres from human-induced pluripotent stem cells using microsphere arrays. *Neuroreport.* 2013;24(2):84-90. doi:10.1097/WNR.0b013e32835cb677
 66. Gil-Perotín S, Duran-Moreno M, Cebrián-Silla A, Ramírez M, García-Belda P, García-Verdugo JM. Adult neural stem cells from the subventricular zone: A review of the neurosphere assay. *Anat Rec.* 2013;296(9):1435-1452. doi:10.1002/ar.22746
 67. Cheng LS, Graham HK, Pan WH, et al. Optimizing neurogenic potential of enteric neurospheres for treatment of neurointestinal diseases. *J Surg Res.* 2016;206(2):451-459. doi:10.1016/j.jss.2016.08.035
 68. Hellwig C, Barenys M, Baumann J, et al. Culture of human neurospheres in 3D scaffolds for developmental neurotoxicity testing. *Toxicol Vitro.* 2018;52:106-115. doi:10.1016/j.tiv.2018.06.002
 69. Mazur-Kolecka B, Cohen IL, Jenkins EC, Kaczmariski W, Flory M, Frackowiak J. Altered development of neuronal progenitor cells after stimulation with autistic blood sera. *Brain Res.* 2007;1168(1):11-20. doi:10.1016/j.brainres.2007.06.084

70. Lewis EMA, Meganathan K, Baldrige D, et al. Cellular and molecular characterization of multiplex autism in human induced pluripotent stem cell-derived neurons. *Mol Autism*. 2019;10(1):1-23. doi:10.1186/s13229-019-0306-0
71. Sampaio GL de A, Martins GLS, Paredes BD, et al. Generation of an induced pluripotent stem cell line from a patient with autism spectrum disorder and SCN2A haploinsufficiency. *Stem Cell Res*. 2019;39(May):101488. doi:10.1016/j.scr.2019.101488
72. Grunwald LM, Stock R, Haag K, et al. Comparative characterization of human induced pluripotent stem cells (hiPSC) derived from patients with schizophrenia and autism. *Transl Psychiatry*. 2019;9(1). doi:10.1038/s41398-019-0517-3
73. Chan WK, Griffiths R, Price DJ, Mason JO. Cerebral organoids as tools to identify the developmental roots of autism. *Mol Autism*. 2020;11(1):1-14. doi:10.1186/s13229-020-00360-3

APÊNDICE A
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Protocolo nº PCL 01/2019

Pesquisador principal: Bruno Solano de Freitas Souza

PROJETO DE PESQUISA

Título do estudo: células-tronco pluripotentes induzidas e organóides cerebrais como modelo experimental para o estudo fisiopatológico do transtorno do espectro autista

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

I. NOME DO PARTICIPANTE DA PESQUISA E RESPONSÁVEL LEGAL

1. Participante

Nome: _____

2. Responsável legal (se for o caso)

Grau de parentesco: _____

Nome: _____

Rubrica do participante ou responsável legal

Rubrica do pesquisador

II. DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. Título da pesquisa:

Células-tronco pluripotentes induzidas e organóides cerebrais como modelo experimental para o estudo fisiopatológico do transtorno do espectro autista

2. Local de realização:

Centro de Biotecnologia e Terapia Celular - CBTC – Hospital São Rafael

3. Pesquisador Principal:

a. Dr. Bruno Solano de Freitas Souza

4. Informações gerais:

Em 2006, um grupo de pesquisadores japoneses deu um importante passo para um melhor entendimento de diversos tipos de doenças ao descobrirem as células-tronco pluripotentes induzidas, mais conhecidas como "iPS". Estas células podem ser obtidas em laboratório a partir de células do sangue de pessoas adultas, e podem dar origem a qualquer tipo de célula do nosso corpo. Esta nova tecnologia abriu grande perspectivas para o estudo do mecanismo de diversas doenças genéticas, incluindo doenças do espectro autista, o desenvolvimento de novas drogas e tratamentos.

Rubrica do participante ou responsável legal

Rubrica do pesquisador

5. Descrição do estudo:

O objetivo do nosso estudo, para o qual o (a) sr (a) está sendo convidado (a) a participar, é investigar os métodos de funcionamento da célula e moléculas envolvidas no Transtorno do Espectro Autista (TEA) a partir de células-tronco pluripotentes induzidas (iPS), no Centro de Biotecnologia de Terapia Celular (CBTC) do Hospital São Rafael. Neste estudo, pretendemos obter células iPS de pacientes diagnosticados com autismo e indivíduos sem este transtorno.

6. Procedimentos a serem realizados durante o estudo:

Caso aceite participar deste estudo, será colhida uma amostra de sangue (cerca de 15 ml para adultos ou crianças pesando acima de 9 kg), que será obtida por uma punção periférica, em veia do braço realizada por profissional capacitado. Os possíveis danos gerados por este procedimento são desconforto no momento da punção da veia e em alguns casos pequeno acúmulo de sangue, formando um hematoma local. Caso isso aconteça o participante poderá colocar uma compressa de gelo no local da punção para diminuir o hematoma e / ou um remédio analgésico para dor poderá ser prescrito pelo médico pesquisador, após avaliação clínica. O sangue coletado será ao CBTC, onde serão utilizadas as células em um avaliação chamada "in vitro", isto é, pesquisas realizadas em laboratório, como estudos genéticos, dentre outros, sempre preservando a sua identidade e confidencialidade dos dados. Estas células também serão congeladas e armazenadas no CBTC durante todo o tempo de duração do estudo.

Caso se faça necessário suas informações clínicas poderão ser coletadas a partir do seu prontuário médico arquivado nesta instituição.

7. Outras informações:

Ao aceitar participar, o (a) Sr (a) concordará que os pesquisadores estoquem e utilizem o seu material não apenas neste, mas também em outros estudos, inclusive com análises genéticas. Deste modo,

Rubrica do participante ou responsável legal

Rubrica do pesquisador

Protocolo nº PCL 01/2019

Pesquisador principal: Bruno Solano de Freitas Souza

o material estocado poderá ser usado para testar novas drogas e exames diagnósticos, visando desenvolver novas medicações e métodos de diagnóstico e acompanhamento da doença no futuro.

Toda pesquisa a ser realizada com o material armazenado será submetida para aprovação prévia do CEP institucional e, quando for o caso para CONEP que é o Conselho Nacional de Ética em Pesquisa, neste caso o senhor será contatado para assinar novo termo de consentimento. Caso esteja impossibilitado de assinar esse novo termo de consentimento, solicitaremos autorização ao CEP para utilizar seu material biológico armazenado no laboratório.

A qualquer momento e sem quaisquer ônus ou prejuízos você pode solicitar o seu material biológico armazenado, após se manifestar por escrito informando que não tem interesse em manter o material armazenado no centro de pesquisa.

Caso seja seu desejo, os resultados genéticos e de possíveis estados futuros, poderão ser informados através do contato com o médico pesquisador, que está atendendo o senhor, ou através do contato telefônico do pesquisador, que consta neste termo de consentimento.

Do mesmo modo, você também concordará com o descarte do material, sem necessidade de nova autorização, a critério dos pesquisadores deste estudo.

A sua participação é inteiramente voluntária, não acarretará em custos financeiros, e, caso mude de ideia quanto à participação no estudo, o (a) Sr (a) deve sentir-se livre para abandonar o estudo a qualquer momento, sem qualquer prejuízo médico ou desconforto com a equipe do projeto.

Os resultados da pesquisa serão divulgados preservando o sigilo médico e, portanto, a sua identidade não será revelada.

Sinta-se à vontade para entrar em contato sempre que desejar tirar dúvidas ou solicitar maiores informações através dos telefones abaixo:

- Centro de Biotecnologia e Terapia Celular do Hospital São Rafael: 3281-6489 ou 32816970
- Contato do pesquisador principal - Dr. Bruno Solano de Freitas Souza:
Endereço – Rua Pituba, 138. Apt. 705, Alphaville I, CEP: 41701-025. Salvador - BA
E-mail – bruno.souza@hsr.com.br
Telefone pessoal (71) 99609-4666

Rubrica do participante ou responsável legal

Rubrica do pesquisador

- Comitê de Ética do Hospital São Rafael, fica alocado na Av. São Rafael, nº 2152, B: São Marcos, Salvador – BA. CEP: 41.253-190, telefone de contato 3281-6484, e-mail cep@hsr.com.br, sobre a Coordenação da Dra. Regina Oliveira e Secretário Sr. Moises Oliveira..

8. As atribuições dos Comitês de Ética em Pesquisa (CEP):

O CEP é um órgão colegiado, ou seja é formado por um grupo de pessoas com o mesmo interesse (proteger o participante de pesquisa), com formação diversificada, com importância à população, com dever de ensinar e orientar as medidas a serem tomadas para o desenvolvimento de um projeto, fiscalizar o andamento do mesmo e guardar os direitos éticos dos participantes inseridos nas pesquisas.

Suas atribuições segundo a lei 466/12 no capítulo VIII (§), inciso 1,2 e 3, são: avaliar protocolos de pesquisa envolvendo seres humanos, com prioridade nos temas de relevância (interesse) público e do SUS, com base nos indicadores epidemiológicos (dados da população), emitindo parecer, devidamente justificado (liberar um documento com todas as observações a serem revisadas pelo pesquisador), sempre orientado, dentre outros, pelos princípios da impessoalidade (se preocupando com todos), transparência, razoabilidade (com característica útil a todos), proporcionalidade (sendo igual a todos) e eficiência, dentro dos prazos estabelecidos em norma operacional (regra), evitando redundâncias (duplicação das informações) que resultem em morosidade (demora) na análise (avaliação); VIII.2 - desempenhar papel consultivo e educativo em questões de ética; e VIII.3 - elaborar seu Regimento Interno (documento interno de normas e regras).

9. Consentimento do paciente:

Li, este documento, retirei minhas dúvidas e concordo em participar desta pesquisa eu e o pesquisador rubricamos todas as páginas e assinamos a última, de duas vias deste documento, de igual teor. Tenho plena liberdade para decidir a respeito da minha espontânea participação nesta pesquisa, assim como sair dela, sem qualquer dano se assim desejar. O meu material colhido pode ser utilizado para

Rubrica do participante ou responsável legal

Rubrica do pesquisador

Protocolo nº PCL 01/2019

Pesquisador principal: Bruno Solano de Freitas Souza

esta e para outras pesquisas, desde que eu ou meu responsável citado abaixo, seja previamente comunicado, para conhecimento da nova pesquisa. O material coletado poderá ser descartado tão logo não seja mais necessário.

Inserir aqui o desejo de ser informado de novas pesquisas para assinar ou não o TCLE.

Nome de uma pessoa responsável pelas amostras biológicas em caso de óbito ou incapacidade: _____

Contato telefônico: _____

1. Participante/Responsável legal:

a. Data: _____

b. Nome: _____

c. Assinatura: _____

2. Pesquisador:

a. Data: _____

b. Nome: _____

c. Assinatura: _____

3. Testemunha imparcial:

a. Data: _____

b. Nome: _____


c. Assinatura: _____

Rubrica do participante ou responsável legal

Rubrica do pesquisador

APÊNDICE B

APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



[principal](#)
[sair](#)

Público
Pesquisador
Alterar Meus Dados


MOISES SANTANA OLIVEIRA - | V3.2
 Sua sessão expira em: 33min 30

Você está em: Público > Buscar Pesquisas Aprovadas > Detalhar Projeto de Pesquisa

DETALHAR PROJETO DE PESQUISA

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título Público: CÉLULAS-TRONCO PLURIPOTENTES INDUZIDAS E ORGANÓIDES CEREBRAIS COMO MODELO EXPERIMENTAL PARA O ESTUDO FISIOPATOLÓGICO DO TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA
 Pesquisador Responsável: BRUNO SOLANO DE FREITAS SOUZA
 Contato Público: BRUNO SOLANO DE FREITAS SOUZA
 Condições de saúde ou problemas estudados: Transtorno do Espectro Autista
 Descritores CID - Gerais: Autismo infantil
 Descritores CID - Específicos: Autismo infantil
 Descritores CID - da Intervenção:
 Data de Aprovação Ética do CEP/CONEP: 19/05/2020



DADOS DA INSTITUIÇÃO PROPONENTE

Nome da Instituição: HOSPITAL SAO RAFAEL S.A
 Cidade: SALVADOR

DADOS DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Comitê de Ética Responsável: 48 - Hospital São Rafael
 Endereço: Av. São Rafael, nº 2152 - 6º andar
 Telefone: (71)3281-6484
 E-mail: cep@hsr.com.br

CENTRO(S) PARTICIPANTE(S) DO PROJETO DE PESQUISA

CENTRO(S) COPARTICIPANTE(S) DO PROJETO DE PESQUISA

APÊNDICE C
ORÇAMENTO

ELEMENTO DE DESPESA	Valor específico	Valor geral
Impressão	R\$ 50,00	
Transporte	R\$ 7.000,00	
Alimentação	R\$ 1.400,00	
Outros serviços e encargos	R\$ 800,00	
SUBTOTAL DE CUSTEIO		R\$ 9.250,00
Notebook	R\$ 1.750,00	
Equipamentos de cultura	R\$ 120.000,00	
Equipamentos de análise	R\$ 1.630.000,00	
Meios e reagentes de cultura	R\$ 66.000,00	
SUBTOTAL DE CAPITAL		R\$ 1.817.750,00
Bolsa de iniciação científica	R\$ 9.600,00	
SUBTOTAL DE BOLSAS		R\$ 9.600,00
TOTAL		R\$ 1.836.600,00

Fonte: Próprio autor.

APÊNDICE D
CRONOGRAMA

Atividade	Semestres			
	2019.1	2020.1	2020.2	2021.1
Revisão bibliográfica	X	X	X	X
Desenho do estudo	X	X		
Cultivo de iPSCs	X			
Formação de organoides cerebrais	X			
Cultivo de NSC	X	X	X	
Formação de neuroesferas	X	X	X	
Análises dos resultados	X	X	X	X
Redação do TCC		X	X	X
Defesa e entrega do relatório				X

Fonte: Próprio autor.

APÊNDICE E
EXOMA DO PACIENTE QUE GEROU AS CÉLULAS iM5

Gene/ Isoforma	Variante Genética (Nucleotídeos/ Aminoácidos)	Localização Cromossômica	Padrão de Herança	Zigosidade
<i>NRXN2</i> (NM_015080)	c.G1090A p.V364I	11:64685708	Não-Mendeliano	Heterozigoto
<i>RELN</i> (NM_173054)	c.G3839A p.G1280E	7:103593755	Não-Mendeliano	Heterozigoto
<i>SCN2A</i> (NM_001040143)	c.C2566T p.R856X	2:165344558	Não-Mendeliano	Heterozigoto
<i>VPS13B</i> (NM_152564)	c.A8903G p.N2968S	8:99820031	Não-Mendeliano	Heterozigoto

Fonte: Próprio autor.