



ESCOLA BAHIANA DE MEDICINA E SAÚDE PÚBLICA

GABRIEL VIANNA PEREIRA ARGÃO

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**UTILIZAÇÃO DE CÉLULAS TRONCO PLURIPOTENTES INDUZIDAS  
PARA MODELAGEM DO TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA IN  
VITRO: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA**

**SALVADOR - BA**

**GABRIEL VIANNA PEREIRA ARAGÃO**

**UTILIZAÇÃO DE CÉLULAS TRONCO PLURIPOTENTES INDUZIDAS PARA  
MODELAGEM DO TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA IN VITRO: UMA  
REVISÃO SISTEMÁTICA**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado à Escola Bahiana de Medicina e  
Saúde Pública (EBMSP) como requisito  
parcial para aprovação no 4º ano de medicina

Orientadora: Msc. Gabriela Louise de  
Almeida Sampaio

Co-orientadora: Dra. Milena Botelho Pereira  
Soares

**Salvador**

**2022**

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço aos meus pais Sylvia Vianna Pereira Aragão e André Luiz Aragão e Silva, que sempre estiveram ao meu lado e me apoiaram nas minhas escolhas, desafios e decisões. Sei que sem eles, estar cursando um curso pelo qual sou apaixonado, desenvolvendo habilidades científicas, bem como partilhar e acumular conhecimento nessa área tão fascinante seria impossível. Serei para sempre eternamente grato pelas oportunidades que eles me proporcionaram, sabendo que carrego grandes responsabilidades devido ao conhecimento que tive privilégio de acessar. Que tal fator guie meu caminho para ofertar sempre aquilo de melhor para meus futuros pacientes.

Agradeço à equipe do Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia (LETI) e do SENAI-CIMATEC, em especial à minha orientadora Msc. Gabriela Louise de Almeida Sampaio, importante mentora da minha trajetória acadêmica no laboratório, que sempre se mostrou apta a me ajudar, mesmo quando as situações tornaram-se complicadas. Sou muito grato pelo seu apoio nesse momento final, especialmente, e guardo grande admiração por sua postura e ensinamentos. Agradeço também a minha co-orientadora Dra. Milena Pereira Botelho Soares pela oportunidade de navegar em um mundo pelo qual sou grande admirador, fazendo com que eu pudesse desenvolver e aprimorar minhas habilidades científicas, algo que carregarei para sempre na vida, visto que pretendo seguir uma carreira com foco no desenvolvimento da ciência biomédica e médica.

Agradeço em especial também a minha avó paterna e meu avô materno. Suas casas são ambientes que frequento rotineiramente e nos quais fui sempre muito bem acolhido para poder trabalhar no desenvolvimento dessa monografia. São figuras por quais guardo imensa admiração e carinho.

Por fim, agradeço aos meus colegas, companheiros e, sobretudo, grandes amigos que a faculdade me proporcionou. Nossas conversas diárias fazem com que esse ambiente denso e as vezes estressante torne-se mais leve e afável. A João Victor Simões Castro Perrone, Leonardo Magalhães Andrade e Silva, Maria Clara Souza de Freitas, João Lucas Cabral Campos, Marllus Roberto Cunha dos Santos, Maria Carolina Santos de Moraes e Nathalia Magalhães Andrade, meu muito obrigado.

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** O autismo é um transtorno do neurodesenvolvimento caracterizado por déficits persistentes na interação e comunicação social, assim como padrões repetitivos e restritivos do comportamento. Em termos epidemiológicos, compreende-se que grande partes dos casos de autismo são idiopáticos, sendo portanto um transtorno geneticamente heterogêneo, em que fatores de risco poligênicos se associam com fatores de risco ambientais para determinar o risco do indivíduo de desenvolver tal transtorno neuropsiquiátrico. O uso de células tronco pluripotentes induzidas e organoides cerebrais tornou possível a avaliação de estágios embrionários de desenvolvimento do SNC *in vitro*, período esse diretamente relacionado com a fisiopatologia do transtorno do espectro autista (TEA). **OBJETIVOS:** Reunir publicações expressivas sobre modelagem *in vitro* do TEA idiopático, buscando evidenciar alterações fenotípicas e genotípicas relevantes nesses modelos experimentais. **METODOLOGIA:** Trata-se de uma Revisão Sistemática guiada pelo protocolo PRISMA em que foi realizada uma busca nas bases de dados do PubMed, Science Direct, ERIC, BVS e Scielo. Os artigos foram extraídos e analisados quanto aos critérios de inclusão e exclusão. Foram incluídos estudos experimentais nos quais foram realizadas a modelagem *in vitro* de autismo idiopático. **RESULTADOS:** Foram identificados 1105 artigos, dos quais após a leitura do título e resumo com aplicação dos critérios de elegibilidade e exclusão das duplicatas, 18 foram selecionados para leitura integral do texto com nova aplicação dos critérios. Desse total, 10 artigos foram incluídos nessa análise. No total foram 96 participantes, dos quais 46 possuíam o diagnóstico de autismo. As principais alterações fenotípicas evidenciadas envolviam distúrbios na proliferação, migração, diferenciação e eletrofisiologia neuronal. Genotipicamente, foi demonstrado que tais células possuíam padrões distintos de expressão gênica através da análise transcriptômica. **DISCUSSÃO:** Frente aos estudos incluídos nesta revisão sistemática, foi demonstrado que neurônios de pacientes com TEA apresentavam distúrbios proliferativos, migratórios, desregulação do sistema GABA/glutamatérgico e alterações eletrofisiológicas justificada por disfunções de canais iônicos específicos. Além disso, genotipicamente tais células apresentavam uma série de genes diferencialmente expressos que diretamente regulam processos associados ao desenvolvimento adequado do sistema nervoso central (SNC). **CONCLUSÃO:** A presente revisão sistemática demonstrou alterações fenotípicas e genotípicas significativas entre células neuroprogenitoras, neurônios e organoides cerebrais derivados de pacientes com autismo comparativamente aos modelos controle. **FINANCIAMENTO:** Não há fontes de financiamento.

**Palavras-chave:** autismo; iPSCs; neurônios; organoides cerebrais; fenótipo; genótipo.

## ABSTRACT

**BACKGROUND:** Autism is a neurodevelopmental disorder characterized by persistent deficits in social interaction and communication, as well as repetitive and restrictive patterns of behavior. In epidemiological terms, it is understood that a large proportion of autism cases are idiopathic, thus being a genetically heterogeneous disorder, in which polygenic risk factors are associated with environmental risk factors to determine an individual's risk of developing this neurodevelopmental disorder. The use of induced pluripotent stem cells and brain organoids has made possible the evaluation of embryonic stages of CNS development in vitro, a period directly related to the pathophysiology of the autistic spectrum disorder (ASD). **OBJECTIVES:** To gather expressive publications on in vitro modeling of idiopathic ASD, seeking to highlight relevant phenotypic and genotypic alterations in these experimental models. **METHODS:** This is a Systematic Review guided by the PRISMA protocol in which articles were analyzed and gathered from the PubMed, Science Direct, ERIC, BVS and Scielo databases. These surveys were extracted and analyzed for inclusion and exclusion criteria. Experimental studies in which in vitro modeling of idiopathic autism was performed were included. **RESULTS:** A total of 1105 articles were identified, of which, after reading the title and abstract, applying the eligibility criteria, and excluding duplicates, 18 were selected for full-text reading with new application of the criteria. From this total, 10 articles were included in this analysis. In total, there were 96 participants, 46 of whom were diagnosed with autism. The main phenotypic alterations evidenced involved disturbances in proliferation, migration, differentiation, and neuronal electrophysiology. Genotypically, these cells were shown to have distinct patterns of gene expression by transcriptomic analysis. **DISCUSSION:** In view of the studies included in this systematic review, it was demonstrated that neurons from patients with ASD presented proliferative and migratory disturbances, dysregulation of the GABA/glutamatergic system, and electrophysiological alterations justified by dysfunctions of specific ion channels. In addition, genotypically these cells presented several differentially expressed genes that directly regulate processes associated with proper development of the central nervous system (CNS). **CONCLUSION:** The present systematic review demonstrated significant phenotypic and genotypic alterations among neuroprogenitor cells, neurons and brain organoids derived from patients with autism compared to control models **FUNDING:** There are no sources of funding.

**Keywords:** autism; iPSCs; neurons; brain organoids; phenotype; genotype.

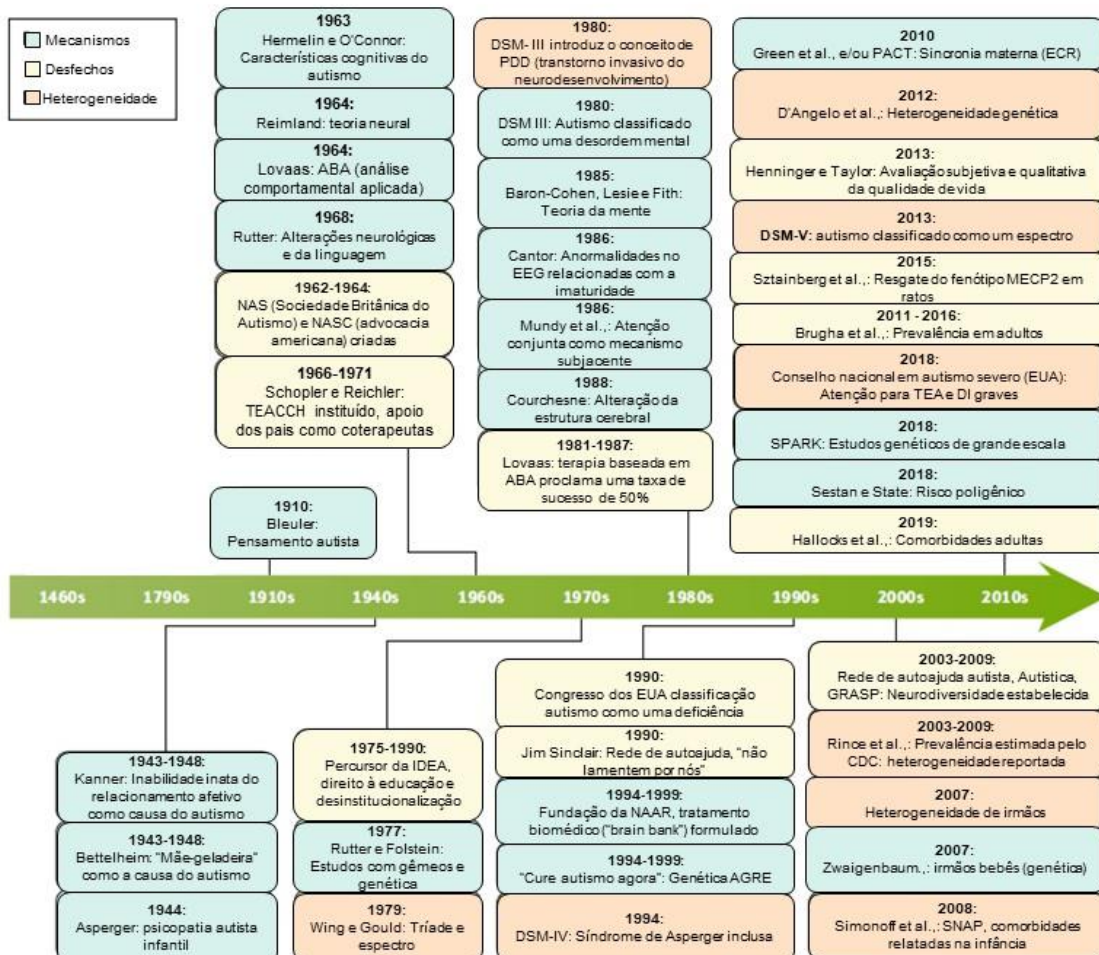
## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	7
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	13
2.1	Objetivo Primário .....	13
2.2	Objetivos secundários .....	13
<b>3</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	14
<b>4</b>	<b>MÉTODOS</b> .....	25
4.1	Desenho de estudo .....	25
4.2	Estratégia de busca .....	25
4.3	Critérios de Elegibilidade .....	25
4.4	Identificação e seleção dos estudos .....	26
4.5	Extração de dados e análise .....	26
4.6	Considerações éticas .....	27
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	28
5.1	Seleção dos estudos .....	28
5.2	Características clínicas dos estudos incluídos .....	29
5.3	Características fenotípicas e genotípicas celulares .....	32
5.3.1	Características fenotípicas.....	32
5.3.2	Características genotípicas e análise transcriptômica .....	35
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	37
6.1	Limitações .....	41
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	43
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	44
	<b>ANEXO</b> .....	54

# 1 INTRODUÇÃO

Autismo é uma síndrome comportamental com etiologias diferentes, na qual o processo de neurodesenvolvimento infantil encontra-se profundamente distorcido. Inicialmente, o termo autismo foi utilizado por Bleuler, em uma edição de 1912 do *American Journal of Insanity*, para designar a perda do contato com a realidade, que acarretava uma grande dificuldade ou impossibilidade de comunicação, ainda sob o ponto de vista da esquizofrenia<sup>1</sup>. O Autismo foi descrito pela primeira vez em 1943 por Leo Kanner após o estudo de um grupo de onze crianças. Kanner deu especial relevância à incapacidade destas crianças em se relacionarem com os outros e no fato de aparentarem viver no seu próprio mundo. Em 1988, Lorna Wing introduziu o termo “Espectro do Autismo”. As Perturbações do Espectro Autista (PEA) se manifestam em nível comportamental num tronco comum denominado de Tríade de Lorna Wing caracterizada por desvios na comunicação, na interação social e na imaginação<sup>2</sup>. Um breve histórico do autismo, com os principais marcos, pode ser encontrado na figura 1.

**Figura 1-** Histórico do estudo acerca do autismo, relatando as principais teorias, desfechos e pesquisas relacionadas a heterogeneidade do transtorno.



Fonte: Lord et al., 2020<sup>3</sup>. Descrições originais acerca do autismo envolviam uma grande variedade de causas, inclusive o crescimento com lobos, uma mãe distante (“mãe-geladeira”), incapacidades inatas de desenvolvimento do relacionamento afetivo, dentre outras. O conceito do autismo ser uma desordem do neurodesenvolvimento com características hereditárias, além de fatores cognitivos subjacentes começou com o reconhecimento de diferenças na função cerebral desses indivíduos na década de 1960. A partir de 1970, sociedades com foco no autismo passaram a focar em programas de integração e desinstitucionalização, como a *National Autistic Society* (NAS) e *National Society for Autistic Children* (NSAC). Prioridades mudaram nas décadas de 1980 e 1990, com maiores focos na terapia do transtorno, bem como nos mecanismos fisiopatológicos associados ao TEA, visando impulsionar a descoberta de novos alvos biológicos para o tratamento. O reconhecimento da heterogeneidade do transtorno começou a partir dos anos 70, com a tríade do acometimento da linguagem, brincadeiras e interação social afetando em diferentes graus e gravidades as crianças com deficiência intelectual ou com atributos clássicos de autismo. Além disso, o primeiro estudo com gêmeos monozigóticos com TEA demonstrou que, apesar dos sinais clássicos de autismo presente em ambos, características específicas, grau de afecção e comorbidades eram diferentes, incluindo a DI, eram distintas entre os irmãos. ABA: análise comportamental aplicada; TEACCH: Tratamento e Educação de Crianças com deficiência de comunicação Autista e afins; DSM: Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais; EEG: eletroencefalograma; ECR: Ensaio Clínico Randomizado; MECP2: Gene associado com a síndrome de Rett; SPARK: Simons Foundation Powering Autism Research for Knowledge; IDEA: Lei da Educação dos Indivíduos com Deficiência; AGRE: Autism Genetic Resource Exchange; GRASP: Parceria global e regional para a Síndrome de Asperger; CDC: Centro de Controle e Prevenção de Doenças; SNAP: Projeto Necessidades Especiais e Autismo.

Em termos gerais, podemos compreender o espectro do autismo como um grupo geneticamente heterogêneo de desordens que levam a um atraso global do neurodesenvolvimento, caracterizado a partir de déficits mais pronunciados na comunicação social e na interação social, assim como padrões restritivos e repetitivos do comportamento<sup>4-6</sup>. A genética por trás desse transtorno do neurodesenvolvimento é extremamente complexa e variável entre os indivíduos, indo desde causas sindrômicas e monogênicas do TEA (transtorno do espectro autista) até as causas idiopáticas em que múltiplos fatores genéticos e ambientais se somam para contribuir para um elevado risco de desenvolver o transtorno. Tais fatores dificultam a compreensão dos mecanismos fisiopatológicos que justifiquem as alterações perceptíveis em pessoas autistas<sup>7</sup>.

Sendo o autismo um transtorno heterogêneo do neurodesenvolvimento e, refletindo essa heterogeneidade, as formas de apresentação do quadro são variáveis. Há tanto a presença de indivíduos mais gravemente acometidos assim como aqueles que possuem manifestações mais leves, com menor comprometimento em suas habilidades sociais e comunicativas, sendo o transtorno neuropsiquiátrico classificado dentro dos “transtornos invasivos do neurodesenvolvimento”. Desde 1980, tal classificação vem sendo adotada a partir de sua inclusão no DSM-III, visando adotar essa ideia de um espectro amplo de déficits na comunicação social. Todavia, devido à ausência de um limiar claro que separasse os “transtornos invasivos do neurodesenvolvimento”, de forma que fosse possível diferenciá-los de forma confiável, os mais recentes sistemas diagnósticos da área (DSM-V e CID-11)



passaram a utilizar o termo guarda-chuva TEA, separando os indivíduos dentro do espectro com base em especificadores e modificadores clínicos adicionais<sup>3</sup>.

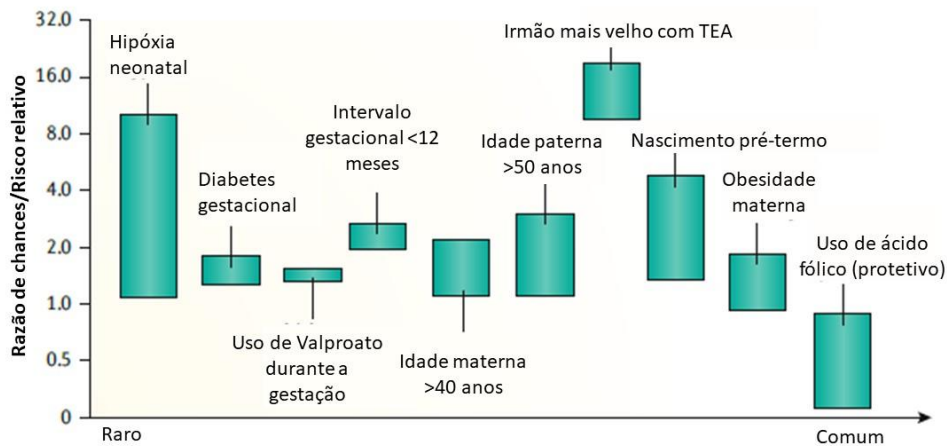
Segundo o DSM-V, o diagnóstico atual de TEA é pautado em: (A) déficits persistentes na comunicação social e na interação social em múltiplos contextos e (B) padrões restritivos e repetitivos de comportamento, interesses ou atividades. Além disso, (C) os sintomas devem estar presentes precocemente no período do desenvolvimento (mas podem não se tornar plenamente manifestos até que as demandas sociais excedam as capacidades limitadas ou podem ser mascarados por estratégias aprendidas tardiamente na vida), (D) os sintomas causam prejuízo clinicamente significativo no funcionamento social, profissional ou em outras áreas importantes da vida do indivíduo no presente e, por fim, (E) essas perturbações não são mais bem explicadas por DI (deficiência intelectual) ou por atraso global do desenvolvimento<sup>8</sup>. O diagnóstico de autismo é normalmente alcançado após a coleta de uma história detalhada do neurodesenvolvimento da criança, usualmente após conversas com os pais, assim como a partir da observação do indivíduo interagindo com os parentes, amigos e outras pessoas<sup>9,10</sup>. Para melhor acurácia diagnóstica, escalas como o protocolo de observação para o diagnóstico de autismo (ADOS) e a entrevista diagnóstica para autismo revisada (ADI-R) devem ser utilizadas. O ADI-R corresponde a uma versão modificada da entrevista diagnóstica para autismo (ADI), sendo um entrevista padronizada e semiestruturada direcionada para os cuidadores de pacientes com provável TEA, fornecendo um algoritmo diagnóstico pautado no CID-10 e no DSM-IV. A entrevista visa distribuir as pontuações nas áreas de comunicação, habilidades sociais e comportamentos restritivos, repetitivos e estereotipados, bem como acessar a história inicial desses sinais e sintomas, permitindo avaliar a gravidade e o impacto em cada uma desses domínios, com bons níveis de sensibilidade para o diagnóstico autismo<sup>11</sup>. O ADOS, por sua vez, é um ensaio de observação padronizada, performada por um clínico especializado, concebida como um método de avaliação da comunicação, habilidades sociais, além dos padrões restritivos e repetitivos do comportamento e dos interesses<sup>12</sup>. Quatro módulos originais são adaptados em função da idade e do nível linguístico do paciente para controle desses efeitos no nível de comprometimento do neurodesenvolvimento apresentado pela criança, visando melhorar a acurácia do teste. A segunda edição do ADOS (ADOS-2) adiciona um quinto módulo (módulo t) para crianças dos 12 aos 30 meses de idade com habilidades linguísticas variando da completa ausência de linguagem verbal até palavras únicas e frases simples<sup>12</sup>. Esses instrumentos permitem que o profissional especializado, na presença do cuidador da criança, observe e caracterize comportamentos característicos do indivíduo com suspeita de TEA<sup>13</sup>, ampliando a sensibilidade, especificidade e acurácia desse diagnóstico<sup>3</sup>.

As manifestações clássicas do autismo incluem déficits na comunicação e interação social, padrões restritivos e repetitivos do comportamento, sendo tais características essenciais para o diagnóstico do TEA, como supracitado, além de anomalias sensoriais e graus variáveis de deficiência intelectual (DI). Além desses sintomas idiossincráticos, comorbidades neuropsiquiátricas são frequentes, das quais destacam-se o transtorno do déficit de atenção e hiperatividade (TDAH), ansiedade, depressão e epilepsia<sup>3</sup>. Apesar desse quadro clínico característico, tais sintomas clássicos de TEA não são bem distinguíveis até os 12 a 18 meses de idade, quando passam a se tornar mais evidentes e discrepantes em relação aos padrões de neurodesenvolvimento esperados para a idade<sup>14</sup>. Além disso, o TEA pode ser classificado como síndrômico em uma série de patologias, incluindo a esclerose tuberosa, síndrome do X frágil, síndrome de Timothy, síndrome de Rett e algumas outras síndromes de aberração cromossômica: Angelman, Prader-Willi e Phelan-McDermid<sup>15</sup>. Tais casos síndrômicos de autismo são mais facilmente modelados *in vitro* devido à sua origem fortemente associada a genes já descritos e dos quais se conhece as características fenotípicas apresentadas pelos organoides, neurônios ou neuroprogenitores, assim como algumas das cascatas intracelulares reguladas por esses genes patologicamente relevantes.<sup>16</sup>

É agora bem reconhecido que fatores genéticos desempenham um papel fundamental na fisiopatologia do transtorno, que em associação com fatores de risco ambientais já bem descritos (figura 2), contribuem para um maior risco da criança de desenvolver TEA. Ainda assim, as bases genéticas que contribuem para as manifestações fenotípicas da doença ainda não são bem compreendidas, dada sua considerável complexidade e variabilidade. Novas evidências apontam que perturbações em períodos críticos do desenvolvimento embrionário podem ser uma das chaves para a emergência da patologia, e sua melhor investigação pode nos proporcionar novos insights acerca das vias patologicamente alteradas no TEA<sup>17</sup>. Por exemplo, estudos de pós-mortem de cérebros autistas identificaram um provável comprometimento ou desregulação do desenvolvimento embrionário desses indivíduos, fazendo com que as redes de conexão neuronal e as sinapses estariam possivelmente deturpadas<sup>17</sup>. Sendo assim, o desenvolvimento embrionário pode ser considerado um período crítico para a manifestação dos mecanismos fisiopatológicos celulares associados ao TEA<sup>18</sup>. Além disso, ensaios de neuroimagem e estudos que avaliam a expressão gênica de cérebros autistas pós-mortem demonstraram uma desregulação de diversos genes relacionados tanto com o desenvolvimento quanto com a proliferação celular<sup>19,20</sup>. Grandes estudos de associação genômica ampla (GWAS), assim como estudos de mutações *de novo* e variações no número de cópias (CNVs)

identificaram uma série de genes significativamente associados com o autismo, sugerindo a importância dessas mutações para a graduação do risco genético da pessoa<sup>21-23</sup>.

**Figura 2-** Fatores de risco ambientais para o desenvolvimento do autismo com bons níveis de evidência associativas.



Fonte: Lord et al., 2020<sup>3</sup>. Dados de estudos que visam identificar os fatores de risco para o autismo podem ser divididos em três grupos, incluindo aqueles com bons níveis de evidência associativas. As barras representam intervalos de confiança (IC 95%).

Mesmo com uma série de fatores genéticos associados ao autismo, na medida em que pesquisas avançam e evidenciam cada vez mais genes diferencialmente expressos (DEGs), a maioria dos casos acontece de forma idiopática. As várias etiologias sindrômicas e monogênicas de TEA acima mencionadas não chegam a contar, per si, para mais do que 2% dos totais de casos de autismo diagnosticados, sendo que apenas cerca de 10-20% dos indivíduos com TEA possuem uma etiologia genética identificável<sup>24</sup>.

O uso de células tronco pluripotentes induzidas fez com que fosse possível avaliar estados embrionários de maturação e desenvolvimento cerebral, mantendo o “background” genético do indivíduo das quais as células foram reprogramadas, partindo do pressuposto de que alterações genéticas nos pacientes autistas influenciariam o desenvolvimento e o comportamento dessas células in vitro, visto que alterações na transmissão sináptica, no crescimento e na diferenciação neuronal constituem eixos centrais nas hipóteses dos distúrbios celulares apresentados nesse transtorno<sup>25-27</sup>.

Apesar dos avanços, lacunas ainda existem na compreensão dos mecanismos moleculares e celulares que circundam o TEA. Busca-se entender de que forma genes mutados e diferencialmente expressos afetam ou desregulam vias específicas de sinalização celular em

neuroprogenitores, capazes de justificar as alterações fenotípicas evidenciadas in vitro na cultura dessas células e, a partir desse ponto, a sintomatologia clássica do transtorno. Resultados de pesquisas mais recentes demonstram que genes associados ao autismo estão funcionalmente interconectados através de vias que controlam diversos processos durante o desenvolvimento embrionário cerebral: regulação da transcrição gênica; diferenciação neural e destino celular; formação e transmissão sináptica; adesão e migração celular e o balanço entre atividade sináptica excitatório e inibitória<sup>25-27</sup>.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Primário**

Investigar a existência de trabalhos que demonstrem como as iPSC, os neurônios e os organoides cerebrais permitem estudar transtornos do espectro autista e quais mecanismos fisiopatológicos podem ser avaliados nesse modelo experimental.

### **2.2 Objetivos secundários**

- I. Reunir publicações relevantes sobre geração de iPSC de pacientes com autismo;
- II. Realizar levantamento das metodologias utilizadas para gerar as iPSC, os neurônios e os organoides;
- III. Descrever quais características fisiopatológicas são avaliadas no modelo in vitro (neuroprogenitores, neurônios e organoides);
- IV. Descrever quais genes estão diretamente associados com um maior risco desenvolvimento do transtorno.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

Células tronco embrionárias (ESC, do inglês *embryonic stem cells*), derivadas da massa celular interna de blastocistos de mamíferos, possuem a capacidade se multiplicar rapidamente e indefinidamente, a partir de diversos processos mitóticos subsequentes, mantendo seu estado de pluripotência. Essas células podem então se diferenciar em tipos específicos celulares das três camadas germinativas do embrião (ectoderma, mesoderma e endoderma) que, em um ambiente normal de fecundação, daria origem a um novo ser vivo<sup>28</sup>. Em 1981, portanto, como demonstrado por Evans e Kaufman, células tronco embrionárias derivadas do blastocisto de ratos 129 SvE seriam adequadamente cultivadas em placas de cultura *in vitro* pela primeira vez, a partir da qual elas poderiam se diferenciar *in vitro* formando múltiplos outros tecidos, ou serem inoculadas em ratos onde levariam a tumores *in vivo* (teratocarcinomas). Tais descobertas e propriedades levaram a expectativas de que células tronco embrionárias humanas poderiam ser utilizadas como modelos de estudos biológicos e fisiopatológicos; teste da eficácia, segurança e tolerabilidade de novas drogas e fármacos, e, com um olhar um pouco mais futurístico, tratamento pacientes com condições clínicas e doenças variáveis através da terapia celular<sup>29</sup>. O termo ESC (célula tronco embrionária), por sinal, foi introduzido justamente para distinguir essas células tronco pluripotente derivadas de embriões com cariótipo normal das células tronco pluripotentes embrionárias derivadas de teratocarcinomas (EC, do inglês *embryonal carcinoma*)<sup>30</sup>.

Logo na sequência, tendo em vista os avanços científicos nessa área no período, ESCs humanas (hESC) foram primeiramente reportadas pelo grupo de Thomson (5) em 1998, 17 anos após a geração e cultura *in vitro* de ESCs de ratos laboratoriais. Esse pequeno atraso entre a criação de células tronco embrionárias de humanos com relação a dos ratos, per se, pode ser explicado por diferenças morfológicas que influenciam na cultura desses dois diferentes tipos de célula. Durante esse intervalo de 17 anos, culturas com ESCs de primatas já haviam sido estabelecidas<sup>31</sup>. Foi proposto então, para classificação adequada de células tronco embrionárias, três critérios deveriam ser considerados, incluindo (I) derivação do embrião pré-implantacional ou peri-implantacional, (II) proliferação indiferenciada e prolongada, e (III) potencial estável de diferenciação para formar todos as três camadas embrionários mesmo após cultura longa *in vitro*<sup>29,31</sup>. Ademais, o experimento da equipe de James A. Thomson demonstrou que as hESC possuíam altos níveis de atividade da enzima telomerase, uma ribonucleoproteína que adiciona repetições de telômeros (sequências de DNA terminais) na região final do cromossomo e está diretamente envolvida na manutenção do comprimento do telômero<sup>32</sup>. O telômero, por sua vez,

constitui esse trecho final do cromossomo e funciona como um relógio mitótico: quando o tamanho do telômero atinge um certo limite, um “checkpoint”, as células são incapazes de se dividir e, portanto, sofrem o processo de senescência celular (envelhecimento). Isso é justamente o que ocorre com nossas células somáticas já diferenciadas, que não expressam tal enzima, uma vez que ela é suprimida pelo processo de diferenciação celular<sup>33</sup>. Destarte, células que expressam altos níveis de atividade da enzima telomerase mantêm o tamanho do telômero e possuem capacidade infinita e indefinida de replicação, o que constitui um marcador de imortalidade celular<sup>34,35</sup>. Assim sendo, a telomerase é altamente expressa em linhagens celulares germinativas e tecidos embrionários<sup>32</sup>.

Apesar dos grandes avanços obtidos através do estudo de células tronco embrionárias humanas (hESCs), há dois grandes problemas ao trabalhar com esse tipo celular: Primeiramente, oposições éticas quanto ao uso de embriões humanos para fins de pesquisa e, em segundo, presença de imunocompatibilidade após o transplante. Guiados por descobertas prévias de que células somáticas poderiam ser reprogramadas a partir da transferência de seus núcleos para oócitos<sup>36</sup> ou por fusão com células embrionárias<sup>37</sup>, o grupo de Takahashi e Yamanaka elaborou a hipótese de que fatores moleculares específicos desses tipos celulares supracitados - oócitos e células embrionárias - conferiam seu estado de pluripotência e, conseqüentemente, sua identidade celular. Portanto, deduziu-se que a pluripotência poderia ser induzida em células somáticas por moléculas específicas que existem no ambiente de ESCs, moléculas essas diretamente associadas com a manutenção desse estado de pluripotência.

Foram selecionados inicialmente 24 fatores candidatos à indução de pluripotência em células somáticas, baseado na hipótese de que tais genes desempenham um papel fundamental na manutenção da identidade celular das células troncos embrionárias. Esses genes foram introduzidos nos fibroblastos embrionários de camundongos (MEF Fbx15 bgeo/bgeo) a partir da transdução viral. Com essa técnica, a partir da modificação genética do retrovírus com o material genético de interesse, seguida sua incorporação no citoplasma da célula (infecção), as células-alvos passarão então a expressar ectopicamente os transgenes desejados, a partir dos vetores retrovirais. Após análises subseqüentes, dos 24 genes iniciais, foram identificados 4 fatores essenciais – *Oct3/4*, *Sox2*, *Klf4* e *cMyc* – capazes de induzir pluripotência em fibroblastos embrionários e também em fibroblastos adultos da ponta da cauda desses mesmos ratos, apesar de que, com o uso de 10 fatores simultâneos, obteve-se essencialmente o mesmo resultado. No caso dos fibroblastos embrionários dos camundongos - MEF Fbx15 bgeo/bgeo – a transdução retroviral de tais fatores combinados foram associados a uma maior sobrevivência da colônia (denominada de IPS-MEF4), maior expressão de genes associados à pluripotência,

morfologia celular mais próxima de células embrionárias e, após injeção subcutânea nos camundongos, três clones de IPS-MEF4 levaram a formação de tumores. A avaliação histológica dos teratocarcinomas revelou que 2 clones da IPS-MEF4 foram capazes de diferenciar em células de todas as 3 camadas embrionárias, incluindo o tecido neuronal, cartilagem e epitélio colunar. Nesse sentido, a imunohistoquímica detectou células positivas para alfa-actina do músculo liso (marcador de mesoderme); alfa feto proteína (marcador de endoderme) e beta III tubulina (marcador de ectoderme). Os clones de IPS-MEF4 também foram positivos no teste de imunohistoquímica para fosfatase alcalina e SSEA-1, marcadores altamente expressos em células tronco indiferenciadas. Por fim, através da técnica biomolecular de microarranjo de DNA, foi comparado à expressão-genética global de ESCs, iPSCs derivadas dos camundongos e MEF Fbx15 bgeo/bgeo. A análise de correlação de Pearson demonstrou que as iPSCs estavam geneticamente mais próximas das ESCs do que dos fibroblastos e seus derivados. Já a análise de microarranjo demonstrou ainda a presença de alguns genes comumente suprarregulados tanto nas células tronco embrionárias quanto nas células tronco pluripotentes induzidas, a exemplo de: *Myb*, *Kit*, *Gdf3* e *Zic3*<sup>38</sup>.

Resultados semelhantes aos descritos acima foram observados após a transdução viral dos mesmos 4 fatores supracitados - *Oct3/4*, *Sox2*, *Klf4* e *cMyc* – em fibroblastos adultos da ponta da cauda de um camundongo macho de 7 semanas (TTFs, do inglês tail-tip fibroblasts) Fbx15 bgeo/bgeo. O mesmo experimento foi repetido com TTFs de uma fêmea Fbx15 bgeo/bgeo de 12 semanas. Após esses ensaios de reprogramação celular, foi realizado a introdução de 2 desses clones celulares de iPSCs derivadas de fibroblastos de camundongos em blastocistos C57/BL6 através da microinjeção, sendo obtido como resultado 18 embriões em E13.5, dois dos quais demonstraram a presença de iPSCs positivas para proteína fluorescente verde (GFP, do inglês green fluorescent protein), proteína essa que era constitutivamente expressa nas células da fêmea após reprogramação genética prévia<sup>38</sup>, demonstrando que tais células poderiam ser reimplantadas em blastocistos para novamente gerar organismos, ou seja, basicamente reiniciar o processo de embriogênese.

Tais achados corroboraram para a hipótese de que seria possível a criação de células pluripotentes diretamente de células somáticas do paciente. Sendo assim, no ano seguinte, 2007, o mesmo grupo de Takahashi e Yamanaka publicou um artigo em que demonstraram a geração iPSCs a partir de fibroblastos adultos de humanos e outras células somáticas humanas<sup>39</sup>.

Depois da otimização da técnica de transdução viral, os retrovírus foram introduzidos em fibroblastos dérmicos adultos de humanos de um caucasiano de 36 anos contendo os



mesmos fatores utilizados na transdução aplicada anteriormente com os fibroblastos de camundongos: *Sox2*, *Oct3/4*, *Klf4* e *c-Myc*. Após 2 semanas, algumas colônias começaram a aparecer nas placas de cultura e as células semelhantes à hESCs foram mecanicamente selecionadas. Cada célula exibia morfologia semelhante à das células tronco embrionárias humanas, com uma alta razão núcleo/citoplasma. Essas células também apresentaram semelhanças as hESCs na “dependência alimentar”, isto é, havia também a necessidade de expansão em “SNL feeder cells”, com meio para células tronco embrionárias de primata suplementado com o fator de crescimento para fibroblastos (bFGF). Tais fatores eram imprescindíveis para a manutenção do estado indiferenciado das novas células, as quais foram denominadas de células tronco pluripotente induzidas de humanos (hiPSCs) <sup>39</sup>.

A partir da análise biomolecular com técnicas semelhantes às aplicadas no caso das iPSCs derivadas de fibroblastos de camundongos, notou-se resultados muito similares: As células tronco pluripotentes induzidas humanas expressavam muitos marcadores e características similares às células pluripotentes embrionárias: padrões de expressão gênica semelhantes, com ativação (acetilação e desmetilação) de promotores gênicos associados à manutenção do fenótipo de células tronco, incluindo a pluripotência, rápida proliferação e indiferenciação; avaliação das histonas por imunoprecipitação de cromatina demonstraram padrões de modificações característicos de hESCs; alta atividade da ribonucleoproteína telomerase; formação de corpos embrióides com diferenciação espontânea para tecidos das três camadas germinativas, demonstrado por imunocitoquímica; utilizando o mesmo protocolo previamente aplicado para ESCs <sup>40</sup>, foi evidenciado diferenciação direta das hiPSCs para células neuronais, incluindo neurônios dopaminérgicos, assim como para cardiomiócitos, valendo-se do uso de ativina A e proteína morfogenética óssea para guiar essa diferenciação <sup>41</sup>; após transplante em ratos do clone de hiPSC 201B7 constatou-se formação de teratoma *in vivo*. A avaliação histológica do tumor revelou que ele era composto por diversos tecidos. Posteriormente, o mesmo método foi utilizado para a produção de hiPSCs a partir de sinoviócitos do tecido sinovial de um adulto caucasiano de 69 anos <sup>39</sup>.

A partir de tais resultados evidenciou-se que células iPSCs poderiam ser geradas a partir de fibroblastos adultos dérmicos e outras células somáticas humanas usando os fatores que posteriormente seriam denominados como fatores Yamanaka. *Oct3/4* e *Sox2* são fatores de transcrição que sinergicamente suprarregulam genes associados à manutenção do estado de pluripotência e indiferenciação celular, ao mesmo tempo em que são capazes de suprimir genes vinculados à diferenciação celular em células tronco embrionárias de camundongos e humanos. Todavia, essas proteínas não conseguem exercer tais funções em células diferenciadas. Nesses

tipos celulares, essas proteínas não são capazes de se ligar aos genes alvos por conta de mecanismos epigenéticos como a metilação do DNA e a modificação das histonas, levando a um maior enovelamento da cromatina em regiões programadas<sup>424344</sup>. Tais dispositivos de modulação genética impedem com que esses fatores de transcrição exerçam sua função a depender da expressão gênica de cada tipo celular. Foi especulado que *c-Myc* e *Klf4* modificam a estrutura de cromatina para que *Sox2* e *Oct3/4* possam interagir com seus genes alvos<sup>39</sup>.

Após essa revolução no estudo de células tronco, diversos protocolos para a geração de iPSCs a partir de células somáticas humanas foram desenvolvidos e aprimorados, assim como a sua diferenciação para diversos outros tipos celulares. O uso de iPSCs para a abordagem de mecanismos fisiopatológicos *in vitro* também foi amplamente desenvolvido, sendo objeto alvo de diversos estudos com grandes fontes de financiamento, entretanto ainda há vários desafios a serem superados para que a medicina regenerativa e a terapia celular se aproximem mais do paciente. Yamanaka reportou 3 obstáculos centrais: (I) Tumorigenicidade, pois essas células tendem a ocasionar a formação de tumores *in vivo* (II) Imunogenicidade, mesmo no caso do transplante autólogo pode haver rejeição e (III) Heterogeneidade, pois cada clone de iPSC possui um perfil genético único e, conseqüentemente, cada linhagem celular é diferente em morfologia, expressão genética, curva de crescimento e propensão para se diferenciar em variados tipos celulares<sup>45</sup>.

Apesar da terapia autóloga de células tronco ser uma realidade um tanto longínqua, o uso de tais células para estudos de doenças genéticas *in vitro* se tornou amplamente popular, de forma que o TEA passou a ser uma das patologias alvo para pesquisa e estudo, dada a sua identidade genética ainda muito obscura e misteriosa. O uso de iPSCs para modelagem de casos síndrômicos de autismo já vêm sendo feito há alguns anos, visto que se conhece a entidade genética alterada (mutação ou alteração cromossômica estrutural) e, a partir desse ponto, estudam-se as implicações de tal variação no desenvolvimento do SNC a partir de organoides cerebrais e também de culturas bidimensionais de neurônios, células da glia e células neuroprogenitoras. Algumas síndromes já estabelecidas e reconhecidas como parte dos TEAs síndrômicos incluem: síndrome de Rett, mutação no gene *CDKL5*, síndrome de Phelan-McDermid, síndrome do X frágil, esclerose tuberosa, síndrome de Timothy e síndrome de Angelman. Tais patologias foram modeladas *in vitro* com achados significativos em termos de fenótipo e genótipo celular<sup>46,47</sup>.

A síndrome de Rett (RTT) é uma desordem do neurodesenvolvimento com uma prevalência consideravelmente maior no sexo feminino, especialmente por causa da maior

mortalidade em meninos (não há o outro cromossomo X com o alelo para compensar a mutação), sendo a primeira forma de autismo sindrômico com uma causa genética bem estabelecida. A maioria dos pacientes com síndrome de Rett possuem uma mutação no gene MECP2, localizado no cromossomo X<sup>48</sup>. Modelagem in vitro da síndrome de Rett utilizando células neuroprogenitoras, neurônios e organoides cerebrais evidenciaram: redução da rede sináptica e das conexões neuronais entre os neurônios; diminuição da densidade dos espinhos dendríticos (pequenas protruções dos dendritos neuronais que constituem o sítio pós-sináptico da maiorias das sinapses excitatórias do cérebro dos mamíferos); redução do tamanho do soma (corpo do neurônio); alteração da sinalização do íon Ca<sup>++</sup> e distúrbios eletrofisiológicos, tais como frequência reduzida de correntes pós-sinápticas espontâneas nos neurônios<sup>49</sup>; defeitos morfológicos em neurônios induzidos por astrócitos mutados derivados pacientes com Rett<sup>50</sup>; susceptibilidade aumentada para retrotransposição L1 e aumento da frequência de *de novo* L1 retrotransposons<sup>51</sup>; Defeitos na migração e maturação neuronal (crescimento reduzido de neuritos e atenuação da sinaptogênese) em ensaios de cultura tridimensionais (organoides)<sup>52</sup>.

CDKL5 é uma mutação genética rara que leva a criança a cursar com um atraso global do neurodesenvolvimento, justificada por mutações nesse mesmo gene, inicialmente inclusa como uma forma atípica da síndrome de Rett. Pacientes com essa mutação apresentam sinais e sintomas clínicos semelhantes à RTT, os quais incluem déficit motor, deficiência intelectual, distúrbios visuais, epilepsia de início precoce e autismo<sup>53,54</sup>. Estudos com iPSCs de pacientes portadores de tal mutação demonstraram que os neurônios diferenciados a partir dessas células tronco apresentavam espinhos dendríticos aberrantes<sup>54</sup>, além de reduções no número de sinapses excitatórias e uma diminuição na densidade dos espinhos dendríticos<sup>55</sup>.

A síndrome de Phelan-McDermid corresponde a um transtorno do neurodesenvolvimento associado a uma deleção no locus gênico de SHANK3 (22q.13), sendo que cerca de 80% dos indivíduos afetados se enquadram dentro do espectro autista, cursando com deficiência intelectual, atraso na comunicação e hipotonia. Correlações genótípicas-fenotípicas demonstraram que, quanto maior a deleção na região do gene do SHANK3, mais aparentes serão as características dismórficas e os sintomas relacionados ao autismo. As pesquisas com iPSCs diferenciadas demonstraram: déficits na transmissão sináptica excitatória, que envolviam tanto a amplitude como a frequência das correntes excitatórias pós-sinápticas, assim como nos potenciais sinápticos evocados (fluxo de corrente iônica) pelos receptores AMPA e NMDA<sup>56</sup>. Ademais, foram identificadas diminuições da densidade e da formação dos espinhos dendríticos<sup>57</sup>.

No que tange a síndrome do X frágil (FXS), temos que ela está relacionada a uma expansão instável da repetição do trinucleotídeo CGG dentro do gene FMR1 (fragile X mental retardation), localizado no Xq27.3, levando a metilação, silenciamento da transcrição gênica e a ausência ou déficit de transcrição da FMRP (fragile X mental retardation protein 1)<sup>58</sup>. Cerca de um terço dos indivíduos com síndrome do X frágil também se enquadram dentro do espectro autista. Em geral, crianças e infanto-juvenis com FXS frequentemente apresentam hipotonia, cursando inicialmente com dificuldades na amamentação e regurgitação frequente, evoluindo na sequência com atrasos na comunicação social, hiperatividade, ansiedade e hiper-reatividade sensorial a partir do segundo ano de vida, sendo isso somado às características dismórficas clássicas (face alongada, orelhas grandes ou proeminentes, pés planos, articulações hiperextensíveis, macroorquidismo após a puberdade dentre algumas outras)<sup>59</sup>. Em termos de fenótipos celulares identificáveis *in vitro*, constataram migração neuronal aberrante de células neuroprogenitoras diretamente correlacionada com mudanças epigenéticas do gene FMR1 e perda da expressão da FMRP<sup>60</sup>; defeitos na formação e extensão dos neuritos (qualquer projeção do corpo celular de um neurônio em cultura de células embrionárias) em neurônios do prosencéfalo derivados de iPSCs de pacientes com FXS<sup>61</sup>, assim como redução da expressão da PSD-95 (proteína 95 de densidade pós-sináptica), redução da *puncta* sináptica no geral, além da diminuição dos neuritos. Foram observados, ademais, desregulações na sinalização de Ca<sup>++</sup>, especialmente nas correntes transitórias de tal íon<sup>62</sup>.

Quanto a esclerose tuberosa, considerada uma etiologia rara de desordem do neurodesenvolvimento, sabe-se que suas manifestações são decorrentes de mutações nos genes TSC1 e TSC2, levando a prejuízos em múltiplos órgãos, incluindo rins, pele, olhos, coração e cérebro. Essa quantidade considerável de órgãos afetados pela patologia implicam no importante papel dos genes TSC1 e TSC2, que codificam o complexo hamartina-tuberina, na regulação da proliferação e migração celular durante a embriogênese<sup>63,64</sup>. É uma doença autossômica dominante, embora dois terços dos pacientes possuam mutações esporádicas, sendo que os indivíduos afetados também podem apresentar déficits e distúrbios no comportamento, psiquiátricos, psicossociais e deficiência intelectual<sup>65</sup>. O autismo é um transtorno frequentemente associado à esclerose tuberosa, acometendo cerca de 61% dos indivíduos, por mais que o mecanismo exato dessa associação ainda permaneça desconhecido<sup>65,66</sup>. Ensaios *in vitro* a partir da cultura das iPSCs diferenciadas em neurônios desses pacientes evidenciaram: aumento da atividade elétrica em rede dos neurônios e expansão dos processos dendríticos dessas mesmas células; Em sistemas de co-cultura com oligodendrócitos, observou-se crescimento do tamanho do *soma* e da densidade dos processos

axonais, assim como hiperproliferação associada a prejuízos na maturação dessas células da glia, que também foram diferenciadas a partir das iPSCs desses pacientes portadores da mutação da esclerose tuberosa<sup>67</sup>; aumento da atividade proliferativa neuronal, hipertrofia do *soma*, desenvolvimento anormal de neuritos e conexões anormais entre as células; Astrócitos apresentaram alta atividade proliferativa; Além disso, a atividade da via mTOR foi potencializada nessas células<sup>68</sup>, via essa que regula uma série de outros fatores de transcrição e a síntese de proteínas especialmente relacionadas com a proliferação, crescimento e sobrevivência celular<sup>69</sup>. Ademais, tais NPCs exibiram atraso na capacidade de se diferenciarem em neurônios<sup>70</sup>.

A síndrome de Timothy (TS) é uma rara desordem multissistêmica nos quais indivíduos apresentam traços capazes de classificá-los dentro do espectro autista, problemas cardíacos, sindactilia, características faciais dismórficas, imunodeficiência e disfunção neurológica<sup>71</sup>. Uma mutação genética *de novo* no gene Cav1.2 é responsável pelas anormalidades fenotípicas da TS em diferentes sistemas e órgãos<sup>72</sup>. A síndrome de Timothy compartilha algumas das características clássicas do autismo, o que o faz ser enquadrado como uma forma sindrômica de tal transtorno, sendo essas: déficits em habilidades de comunicação e socialização, assim como no desenvolvimento da linguagem e da fala. DI e convulsões, outras comorbidades comuns no autismo, também estão presentes na TS. O uso de iPSCs para modelagem dessa doença *in vitro* constatou os seguintes achados: defeitos na sinalização de Ca<sup>++</sup>, assim como anomalias na diferenciação neuronal, com uma redução da expressão de genes normalmente presentes em camadas corticais inferiores e também em projeções do corpo caloso<sup>73</sup>; retração dendrítica atividade-dependente, associada a mutação no gene Cav1.2, assim como déficits na sinalização de Ca<sup>++</sup><sup>74</sup>, como também migração anormal de interneurônios em modelos de organoides<sup>75</sup>.

Por fim, a síndrome de Angelman (AS) é outro transtorno do neurodesenvolvimento relacionado ao TEA, cuja mutação com perda de função no gene UBE3A, localizado região 15q11-q13 do cromossomo maternal, leva a manifestação fenotípica da patologia<sup>76</sup>. Indivíduos com AS costumam apresentar retardo mental profundo, ataxia, explosões contínuas de riso, atraso severo na linguagem e na fala, eletroencefalograma (EEG) alterado e convulsões. Além desses sintomas clássicos descritos, eles podem também apresentar hiperatividade, comportamentos estereotipados e repetitivos, assim como impulsivos<sup>76,77</sup>. Mutações na mesma região cromossômica (15q11-q13), porém no cromossomo paterno homólogo, levam a síndrome de Prader-Willi (PWS), um outro transtorno grave do neurodesenvolvimento com uma grande variabilidade sintomatológica<sup>78</sup>. Os estudos com células tronco de pacientes com

AS revelaram, especialmente, diminuição da atividade e plasticidade sináptica, com alterações do potencial de repouso da membrana e do disparo dos potenciais de ação<sup>79</sup>.

Tais estudos demonstram alterações fenotípicas perceptíveis durante a modelagem *in vitro*, com o uso da tecnologia de organoides cerebrais, de casos sindrômicos de TEA, em que há um distúrbio genético de base bem estabelecido. No entanto, é necessário salientar que a prevalência do autismo na população mundial envolve, majoritariamente, casos poligênicos e idiopáticos, em que a hereditariedade interage com fatores ambientais para estabelecer o risco do indivíduo de desenvolver o quadro. Apesar desse fato epidemiológico, o estudo de casos idiopáticos de TEA foi por muito negligenciado nessas pesquisas experimentais de modelagem, sendo de grande relevância caracterizar as possíveis alterações fenotípicas e genotípicas, bem como se de alguma forma há uma via comum entre esses mecanismos moleculares que justifiquem as manifestações do TEA à nível celular, mesmo em indivíduos sem uma mutação de base comum que justifique o transtorno.

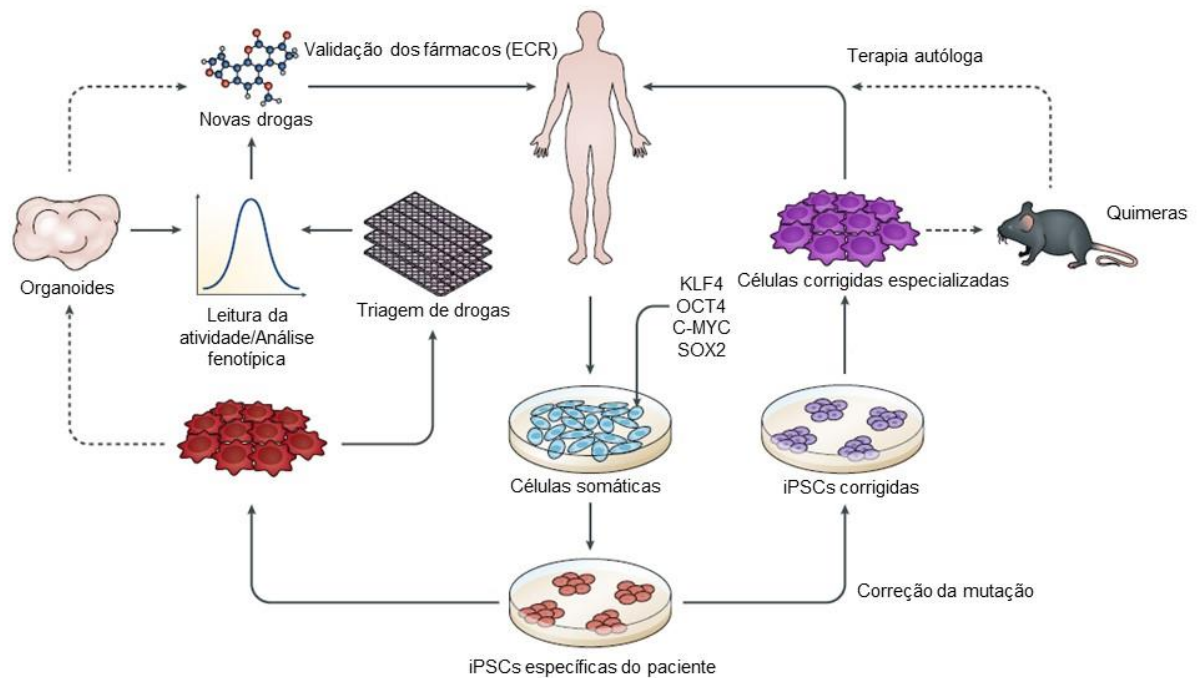
Compreende-se, portanto, que o avanço da tecnologia de organoides, nisso incluso os organoides cerebrais utilizados nos transtornos neuropsiquiátricos supracitados, permitiu com que obstáculos fossem ultrapassadas no estudo de tecidos e do comportamento celular *in vitro*, nisso incluso diversas patologias de interesse científico. O uso dessas culturas 3D aproximam-se mais da citoarquitetura naturalmente presente nos órgãos de indivíduos *in vivo*, sendo portanto objeto de estudo mais verossímil em termos fisiológicos, o que não acontece com culturas de células padrão bidimensionais<sup>80</sup>. Ademais, tais organoides são muito mais passíveis de manipulação genética e das mais variadas vias de sinalização de interesse do que modelos animais. Soma-se a isso, claro, o ponto de não haver as limitações clássicas esperadas no caso do uso de outras espécies (especialmente camundongos) para modelagem de doenças, isto é, as diferenças genéticas e conseqüentemente estruturais dos tecidos que impedem com que o modelo seja fidedigno, dado que estamos tratando de espécies distintas<sup>80</sup>. Outrossim, a reprogramação celular para o estágio de iPSC permitiu com que barreiras fossem ultrapassadas quanto ao uso de células tronco embrionárias, principalmente aquelas que dizem respeito à bioética<sup>81</sup>.

Na medida em que mais pesquisas passaram a ser realizadas na área, progressos foram obtidos não só nos métodos de reprogramação celular, que passaram a ser mais eficientes, como também na quantidade de tecidos dos quais organoides derivados de células tronco pluripotentes (PSCs) foram caracterizados, modelados e testados, incluindo: organoides cerebrais, organoides gastrointestinais e do fígado, bem como organoides cardíacos, pulmonares e também renais. Como tais células pluripotentes são capazes de formar tecidos

dos três folhetos embrionários, conhecer as vias e as moléculas que regulam a diferenciação de cada tecido *in vivo* faz com que seja possível recriar e simular essas vias *in vitro*, dessa forma sendo possível a criação de organoides de todos esses órgãos citados<sup>82</sup>.

Sendo assim, a partir de células somática do paciente, como por exemplo fibroblastos, a reprogramação é executada e técnicas são aplicadas para a formação de aglomerados tridimensionais de células (organoides). Desse ponto, as possibilidades são múltiplas: Caso o paciente possua uma determinada doença, as células podem ser usadas para modelagem *in vitro* dessa patologia de interesse, já que elas mantêm o “background” genético do indivíduo. Desse ponto, as células podem ser diferenciadas para o tecido desejado para análise das alterações fenotípicas, genotípicas e leitura da atividade do tecido, assim como para o teste de drogas, analisando como tais fármacos interagem com o fenótipo celular apresentado<sup>81</sup>. Nesse sentido, iPSCs vêm sendo utilizadas na triagem e validação de possíveis novos fármacos para diversas patologias<sup>83</sup>. O outro ponto chave, porém ainda longínquo, da pesquisa com organoides é justamente avançar em direção à medicina regenerativa, isto é, transplante autólogo de células tronco. A partir de edição gênica precisa com a tecnologia do CRISPR-Cas9, uma mutação causadora de determinada doença no paciente pode ser corrigida, e as células podem ser expandidas *in vitro* em organoides cerebrais. Como o transplante ainda é majoritariamente inviável, tais células podem ser utilizadas para confirmar o efeito da mutação nos fenótipos celulares observáveis, comparando os modelos portadores da mutação com esse modelo isogênico corrigido, assim como podem ser utilizados em modelos quiméricos (transplante xenogênico), visando circundar as limitações da tecnologia, ganhando experiência e abrindo caminhos para essa medicina personalizável(figura 2)<sup>81</sup>.

**Figura 3** - Esquema demonstrando as principais aplicações de iPSCs e dos organoides derivados dessas células específicas do paciente.



**Fonte:** Rowe & Daley., 2019. A partir da descoberta das células tronco pluripotentes, novos passos em direção à terapia celular e triagem de fármacos foram intensificados. Melhoras nas técnicas de reprogramação permitiram com que iPSCs fossem geradas de forma mais eficiente e com a manutenção do estágio de pluripotência *in vitro*, isto é, evitando diferenciação indesejada. Edição gênica com CRISPR/Cas9 tem sido amplamente utilizada, permitindo com que haja a recuperação de um fenótipo associado a uma doença genética, visando no futuro se aproximar mais da terapia autóloga de células tronco. Atualmente, essas células geneticamente corrigidas podem ser transplantadas para modelos quiméricos (transplante xenogênico) para evidenciar o comportamento dessas células em sistemas multicelulares complexos e dinâmicos, considerando a interação com componentes do estroma, sistema imune, hormônios e patógenos, visando ultimamente alcançar a terapia autóloga dessas células, uma realidade ainda longínqua salve raras exceções. *In vitro*, as células de um paciente com uma patologia alvo podem ser reprogramadas a partir de células somáticas quaisquer (por exemplo fibroblastos) para iPSCs, e depois diferenciadas para o tecido alvo para avaliar alterações fenotípicas e genotípicas, alvejando a compreensão de mecanismos fisiopatológicos de interesse e a triagem de fármacos. Ultimamente, esses modelos de estudo em laboratório permitem com que possíveis novos fármacos sejam descobertos e testados, tanto a partir da identificação de mecanismos moleculares chaves da doença, como também a partir da interação da droga com o fenótipo celular. Finalmente, tais testes de triagem de diversas moléculas de interesse podem auxiliar na descoberta de novos fármacos para uso clínico no futuro, abrindo portas também para a medicina personalizada, especialmente através da interação farmacogenética: qual fármaco é mais eficiente para cada tipo de paciente



## 4 MÉTODOS

### 4.1 Desenho de estudo

Trata-se de uma Revisão Sistemática integrando literatura científica de x bancos de dados, pautada no modelo PRISMA (*Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses*). O estudo visa analisar o modelagem do Transtorno do Espectro Autista (TEA) in vitro através do uso de IPSC's para análise fisiopatológica do tecido nervoso (mimetizando aspectos do desenvolvimento embrionário do tecido) em células que possuem mutações características associadas ao fenótipo do autismo.

### 4.2 Estratégia de busca

A estratégia de busca foi realizada conforme o método PICO (*Population, Intervention, Comparisson/Control and Outcome*). Foi realizada uma revisão de literatura através das bases de dados do MEDLINE (através do PubMed), da Biblioteca Virtual em Saúde (BVS), Scielo, ERIC e Science Direct (Elsevier).

Foram utilizadas combinações de descritores retirados do MeSH (*Medical Subject Heading*) e DeCS (*Descritores em Ciências da Saúde*) para os termos “células-tronco pluripotentes induídas” e “autismo”. Para o primeiro, os descritores de saúde utilizados foram, primeiramente em inglês: “*Induced Pluripotent Stem Cells*”; “*IPSC*”; “*IPSC's*”; “*IPS cells*”; “*Cell, IPS*”; “*Human induced pluripotent stem cell*”; “*Human induced pluripotent stem cells*”. No que diz respeito ao TEA, os seguintes descritores foram utilizados: “*Autism*”; “*Autism Spectrum Disorders*”; “*Autistic Spectrum Disorder*”; “*Autistic Spectrum Disorders*”; “*Disorder, Autistic Spectrum*”; “*Rett Syndrome*” e “*Infantile Autism*”. Os operadores booleanos “AND” e “OR” foram aplicados para associar os termos de busca. Os idiomas inglês e português foram selecionados para limitar os estudos abarcados pela pesquisa, bem como o período, que ficou entre os anos de 2015 até 2021.

Para detalhes de estratégias de busca em cada base de dados, consultar Anexo A.

### 4.3 Critérios de Elegibilidade

Incluídos estudos originais, publicados entre os anos de 2010 até 2021, que tivessem seu texto completo em português, inglês ou espanhol, com duração variada de intervenção, apresentando as características: P – IPSC's de indivíduos com autismo; I – Modelagem da

doença (autismo) in vitro, com diferenciação das iPSC's para tecido nervoso (células progenitoras neurais) ou organoides cerebrais, C –IPSC's de indivíduos hígidos ou sem mutações associadas ao espectro autista e outros transtornos do neurodesenvolvimento; O – Alterações fisiopatológicas observáveis a nível neuronal e fenótipos celulares descritos.

Excluiu-se estudos que utilizaram iPSCs de indivíduos que não haviam sido diagnosticados com TEA, conforme os critérios do DSM-V e/ou os questionários ADOS-2 ou ADI-R, bem como os que utilizaram iPSCs editadas geneticamente (via CRISPR/Cas9 ou outros métodos) para a indução de mutações em genes que conferem um maior risco para o desenvolvimento do TEA, assim como os estudos que utilizaram pacientes com autismo associado a comorbidades genéticas características (síndrome do X frágil, síndrome de Down, síndrome de Rett, esclerose tuberosa, síndrome de Timothy dentre outras) ; Estudos que não descrevem qualitativamente ou quantitativamente os achados perceptíveis a nível celular das hiPSC diferenciadas para tecido nervoso; Artigos que não possuíam um grupo controle para comparação dos resultados encontrados em nível de fenótipo celular, de forma que fosse possível contrastar o desenvolvimento dos neurônios de um indivíduo neurotípico comparativamente a de um indivíduo com autismo; os estudos em que as células tronco pluripotentes não eram derivadas de humanos e, por fim, foram removidos os artigos que avaliavam alterações no genótipo e fenótipo celular a partir de substâncias específicas, para análise do potencial terapêutico de tal componente. Artigos de revisão e artigos duplicados entre as bases de dados também foram excluídos.

#### **4.4 Identificação e seleção dos estudos**

Na sequência foi realizada a busca e extração de artigos manualmente dos bancos de dados de literatura científica, sendo na sequência aplicado os critérios de elegibilidade nos artigos filtrados.

O processo de seleção individual se deu em três principais etapas: primeiramente, descarte dos artigos que não cumpriam os critérios de elegibilidade, com base na leitura do título e do resumo; secundamente, exclusão de artigos duplicados entre as bases de dados; e, por fim, leitura íntegra do texto e reaplicação dos critérios de elegibilidade para filtrar outros artigos diversos que também não cumpriam com os critérios já supracitados.

Organização e leitura dos artigos foi realizada com o auxílio da ferramenta *Mendeley Desktop*, versão 1.19.8.

#### **4.5 Extração de dados e análise**

Na sequência foi realizada a análise individual de cada artigo selecionado para leitura íntegra

A extração de dados seguiu com o preenchimento de uma tabela realizada pelo próprio autor. Os principais itens extraídos foram: autores, título, ano, desenho de estudo, revista em que foi publicado e os resultados obtidos.

#### **4.6 Considerações éticas**

Por tratar-se de uma revisão sistemática, não foi necessário submeter o estudo ao Comitê de Ética em Pesquisa.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Seleção dos estudos

Durante o processo de busca nas bases de dados incluídas nessa revisão, foram identificados 1105 artigos, dos quais após a leitura do título e resumo com aplicação dos critérios de elegibilidade e exclusão das duplicatas, 18 foram selecionados para leitura integral do texto com nova aplicação dos critérios. Desse total, 10 artigos foram incluídos nessa análise (Figura 1).

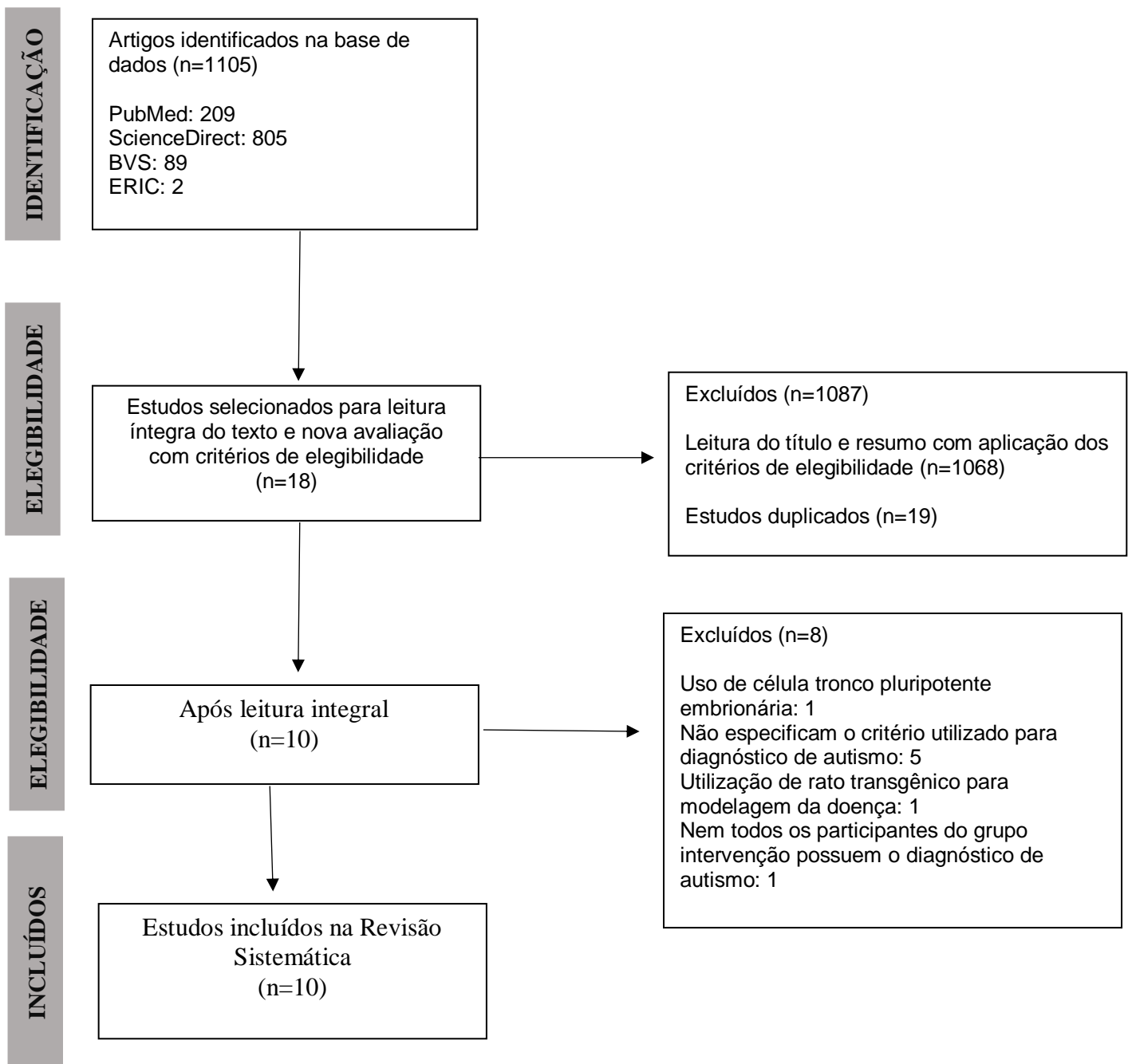


Figura 1- Fluxograma da estratégia de busca de dados

## 5.2 Características clínicas dos estudos incluídos

Na presente revisão sistemática foram incluídos dez artigos, totalizando 96 participantes, dos quais 46 possuíam o diagnóstico de autismo, feito por médicos especializados, conforme os critérios do DSM-IV ou V (Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais) e/ou com base nas escalas diagnósticas de ADOS (protocolo de observação para o diagnóstico de autismo) e ADI-R (entrevista diagnóstica para autismo revisada). Houve grande predomínio do sexo masculino nos pacientes com o diagnóstico de TEA incluídos nesse estudo. Por fim, todos os artigos incluídos tinham um desenho experimental, com tempo de seguimento variados em função dos tipos de experimentos realizados (tabela 1).

**Tabela 1** - Características clínicas dos estudos selecionados

<b>Autores</b>	<b>Ano</b>	<b>Nº de participantes (intervenção)</b>	<b>Nº de participantes (controle)</b>	<b>Diagnóstico de TEA</b>	<b>Gênero</b>
Adhya, et al. 84	2021	9	6	ADOS-2 & ADI-R	14H 1M
Meganathan, et al. 85	2021	1	3	DSM-V	2H 2M
Liu, et al. 86	2017	3	5	ADOS-G & ADI-R	8H
Lewis, et al. 87	2019	2	2	DSM-V & ADOS	1H 3M
Derosa, et al. 88	2018	6	5	DSM-IV & ADI-R	11H
Amatya, et al. 89	2019	8	7	DSM-IV & ADOS	15H
Zaslavsky, et al. 90	2019	2	4	ADOS, ADI-R & ADOS	5H 1M
Avazzadeh, et al. 91	2019	3	5	ADOS & ADI-R	6H 2M

Marchetto, et al. <sup>92</sup>	2017	8	5	DSM-IV, ADOS, ADIR & VBS	13H
Mariani, et al. <sup>93</sup>	2015	4	8	ADOS & VBS	9H 3M

**Fonte:** Dados do próprio autor. Legenda: M= mulheres; H= homens; ADOS: Protocolo de observação para diagnóstico do autismo; ADI-R: entrevista diagnóstica para autismo revisada; DSM: Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais; VBS: Escala de comportamento verbal.

Dos pacientes com diagnóstico de autismo incluídos nessa revisão sistemática, grande parte eram caucasianos (63,3%), seguido de branco não hispânico (20%), caucasiano-hispânico (10%), asiático-indiano e afro-americano, ambos com (3,33%). Comorbidades, quando relatadas, também eram frequentes, com destaque para o transtorno de déficit de atenção com hiperatividade (37,5%), seguida de depressão (25%) e ansiedade (12,5%). O transtorno obsessivo compulsivo, a deficiência intelectual, problemas de sono e as convulsões foram pouco frequentes, com todas representando 6,25% do total de comorbidades.

Foram coletadas amostras de urina, amostras de sangue periférico e amostras de cabelo, além de biópsias de pele, seguida do processo de isolamento e cultura das células a serem reprogramadas para iPSCs. Grande parte dos tipos celulares utilizados para reprogramação foram fibroblastos, conforme previamente explicitado por Shinya Yamanaka <sup>39</sup>. Células epiteliais renais, queratinócitos e células mononucleares de sangue periférico também foram reprogramadas a partir de protocolos específicos.

As reprogramações foram feitas a partir do vírus Sendai, de lentivírus, retrovírus ou método de reprogramação epissomal (mistura de três vetores otimizados de DNA capazes de reprogramar as células-alvo para iPSC's sem ser necessário a integração do material genético no genoma). Todos os métodos de reprogramação funcionam a partir da entrega de genes específicos para as células alvo, levando a superexpressão ectópica de tais fatores, que por sua vez agem como indutores de um estado de pluripotência, fazendo com que a célula retorne de sua identidade diferenciada, como um fibroblasto, para uma identidade desdiferenciada. Dessa forma, ela é novamente capaz de se diferenciar em outro tipo celular qualquer das três camadas do folheto embrionário: endoderme, mesoderme e ectoderme (tabela 2).

**Tabela 2-** Características gerais dos pacientes e dos métodos de reprogramação utilizados.

Referência	Etnia	Idade (grupo intervenção)	Comorbidade	Fonte	Reprogramação
Adhya, et al.	Caucasianos	18,22 ± 9,07 anos	TDAH (2) Depressão (1)	Queratinócitos	Vírus Sendai / Lentivirus
Meganathan, et al.	NR	12 anos	TDAH Depressão	Células epiteliais renais	Vírus Sendai
Liu, et al.	Caucasianos (2) Asiático- indiano (1)	8 ± 1 anos	TOC (1) TDAH (1)	Fibroblastos dérmicos	Lentivírus
Lewis, et al.	NR	NR	Depressão (2) Ansiedade (2) Deficiência intelectual (1)	Células epiteliais renais	Vírus Sendai
Derosa, et al.	Branco não- hispanico	Entre 3 e 21 anos	TDAH (2) Problemas de sono (1) Convulsões (1)	Células mononucleares de sangue periférico	Vírus Sendai
Amatya, et al.	Caucasiano (4) Caucasiano- hispanico (3) Afro- americano (1)	13,3 ± 5,6 anos	NR	Fibroblastos	Retrovírus
Zaslavsky, et al.	NR	NR	NR	Fibroblastos dérmicos	Retrovírus e Vírus Sendai
Avazzadeh, et al.	NR	15,33 ± 6,42 anos	NR	Fibroblastos	Reprogramação episomal

Marchetto, et al.	Caucasiano (4)	13,3 ± 5,6 anos	NR	Fibroblastos	Retrovírus
	Caucasiano- hispanico (3)				
Mariani, et al.	Afro- americano (1)	9,22 ± 4,03 anos	NR	Fibroblastos	Retrovírus e método de reprogramação epissomal
	NR				

**Fonte:** Dados do próprio autor. Legenda: NR = não relatado; TDAH = Transtorno de déficit de atenção e hiperatividade; TOC = Transtorno obsessivo compulsivo; (n) = Número de indivíduo com a comorbidade.

### 5.3 Características fenotípicas e genotípicas celulares

#### 5.3.1 Características fenotípicas

Através do uso de iPSCs para análise fenotípica de alterações celulares, algumas alterações nas células derivadas de pacientes com TEA tornaram-se evidentes quando comparadas com iPSCs de indivíduos controle.

O artigo de Adhya e colaboradores (2020) avaliou a formação de estruturas denominadas rosetas neurais em três diferentes estágios do neurodesenvolvimento *in vitro*: dia nove (estágio inicial de células precursoras neurais, quando iPSCs formam novas células neuroprogenitoras que se auto-organizam em rosetas neurais com um arranjo direcional apico-basal; dia vinte e um (estágio tardio de células precursoras neurais, marcado pela formação de camadas da superfície apical, estando as células neuroprogenitoras prontas para se diferenciarem em neurônios a medida em que elas migram para fora e, por fim, dia trinta e cinco (neurônios corticais imaturos pós-mitóticos). As rosetas neurais são formadas durante a diferenciação de iPSCs para um destino neuronal, de forma que há uma auto-organização celular em estruturas “neuroepiteliais”, que por sua vez dispõem de uma polaridade apico-basal similar àquelas dos tubos neurais durante a embriogênese.

As rosetas neurais formadas a partir de iPSCs diferenciadas em NPCs apresentaram anomalias significativas na formação do lúmen e no estabelecimento da polaridade apico-basal dessas estruturas. Além disso, constatou-se alterações no diâmetro e na formação das rosetas neurais em algumas linhagens de células, bem como um aumento na geração de rosetas neurais



por 100 células. Tal formação anômala de rosetas neurais foi recapitulada no dia 30 dos organoides cerebrais, com menos dessas estruturas completas nos organoides derivados de pacientes com TEA, sendo tal fenótipo evidente independentemente de alterações na proliferação celular.

Em termos de proliferação celular, dois artigos (Marchetto et al., 2017) (Mariani et al., 2015) constataram uma tendência de aceleração da proliferação celular em NPCs de pacientes com TEA e macrocefalia, sendo observado tanto reduções significativas no tempo de duração do ciclo celular em células neuroprogenitoras, com encurtamento das fases G1 e S, sem alteração do comprimento, isto é, do tempo da fase G2-M. A proliferação foi medida (2 clones por linhagem de célula) calculando o tempo de duplicação da população a partir do plaqueamento nas passagens 3 a 7 (P3-7) em cultura contínua, e os tempos de duplicação de todas as células derivadas de pacientes com TEA e linhas de controle foram agrupados para calcular as médias ou por incorporação do análogo de timidina BrdU, um marcador de mitose celular, através da fórmula  $Tc = Ts / (\%BrdU / Ki67)$ , em que Tc representa o tempo total do ciclo celular e Ts é o tempo na fase S do ciclo e Ki67 é uma proteína nuclear de 300kDa que está presente durante todas as fases ativas do ciclo celular (G1, S, G2 e mitose), mas não é detectável nas células em repouso (G0), sendo portanto um excelente marcador de proliferação celular<sup>94</sup>.

Meganathan e colaboradores (2021) também constataram uma tendência de mais rápida proliferação celular nas NPCs derivadas de um paciente com TEA portador de uma duplicação da região cromossômica 15q13.3, envolvendo o gene CHRNA7, mensurado a partir da contagem de células após 4 dias de cultura. Tais NPCs apresentaram porcentagens significativamente maiores de células na fase S e M do ciclo celular, em comparação com NPCs de controle não relacionados.

No que diz respeito a diferenciação neuronal e destino celular, foi constatado por Mariani e colaboradores (2015), assim como por Adhya e colaboradores (2020), um desbalanço do sistema GABA-glutamatergico, com uma tendência de aumento da expressão de neurônios precursoros GABAérgicos, testado especialmente através de marcadores específicos para esses tipos de células precursoras de neurônios inibitórios, como DLX-1, DLX-2 (fatores de transcrição) e GAD1/GAD67. Além disso, o número de células imunorreativas para ASCL1/MASH1 e NKX2.1 (dois fatores de transcrição expressos por células progenitoras GABAérgicas) e para o neurotransmissor GABA também estavam aumentados em organoides derivados de pacientes com TEA. Foram conduzidas ainda análises de Western blot que confirmaram a expressão proteica aumentada de GAD1/2 em organoides TEA, sugerindo uma superprodução de progenitores e neurônios da linhagem GABAérgica, bem como um equilíbrio

alterado entre o número de neurônios excitatórios e inibitórios. Por fim, foram encontradas evidências de aumento da expressão de fenótipos GABAérgicos eletrofisiologicamente, através do aumento da expressão da isoformas Nav1.1 dos canais de sódio, isoformas essa mais expressa em neurônios GABAérgicos. Outro estudo (Marchetto et al., 2017) revelou uma redução da porcentagem de NPCs NGN2+ glutamatérgicas em comparação com controles. Enquanto de forma consistente com os demais estudos, marcadores de precursores inibitórios GABAérgicos presentes no subpálio (MASH1, DLX2 e NKX2.1) foram regulados positivamente no TEA. Curiosamente, esse mesmo estudo constatou uma tendência para os receptores do GABA e do neuropeptídeo Y serem regulados negativamente em neurônios derivados de TEA. Foi também observado uma regulação negativa do receptor GABA, GABRR1, além de outros neurotransmissores relevantes e genes relacionados à sinapse, como KCNA1, TH, PHOX2A e DRD3, em neurônios TEA. Em contraste, genes relacionados a estágios iniciais de diferenciação neural, como NEUROG3, FOXG1, SOX10 e P2RY2, foram significativamente suprarregulados no TEA. Foram ainda evidenciados achados contraditórios quanto ao grau de maturação neuronal, visto que estudos revelaram tanto uma imaturidade dos neurônios derivados de pacientes com autismo (Meganathan et al., 2021) (Marchetto et al., 2017), demonstrado através de maior expressão de marcadores de NPCs e de proliferação celular, quanto também por uma aquisição prejudicada de características de neurônios diferenciados e maduros. Outros estudos (Mariani et al., 2015) (Liu et al., 2017), por sua vez, não detectaram alterações significativas no grau de maturação neuronal entre neurônios durante o processo de diferenciação *in vitro* de pacientes com TEA em comparação com controles. Por fim, déficits na migração neuronal através de ensaios específicos também foram atestados nos neurônios de pacientes com autismo (Meganathan et al., 2021) (DeRosa et al., 2018).

As pesquisas também demonstraram alterações da atividade eletrofisiológica dos neurônios derivados de pacientes com autismo (Amatya et al., 2019) (Avazzadeh et al., 2019) (Marchetto et al., 2017) (Liu et al., 2017) (DeRosa et al., 2018) (Zaslavsky et al., 2019), sendo essas: redução da complexidade elétrica dinâmica analisada através de MED (Minimal embedding dimension), assim como os disparos e a variação de intervalo entre os picos foram significativamente distintas entre neurônios controle e TEA, mais evidentes durante as primeiras semanas de diferenciação, com tendência a ajustes a partir de terceira semana. Gravações de *whole cell voltage* e *current clamp* identificaram maior número de disparo de potenciais de ação, em média, bem como um limiar menor de despolarização para início do potencial de ação, demonstrado através de uma reobase (corrente de despolarização mínima necessária para atingir o limiar do potencial de ação) substancialmente menor, além de um

declínio mais significativo na amplitude média do pico do potencial de ação a cada disparo sucessivo. Foi observado também a manutenção de um estágio mais excitável desses neurônios em pacientes portadores de uma CNV na região cromossômica 15q13.3, envolvendo o gene *CHRNA7*. Análises a partir de matrizes multieletrodos (MEA) revelaram diminuição da atividade de disparos espontâneos em neurônios de pacientes com TEA, que não aumentaram de forma proporcional aos neurônios controle na medida em que havia maturação neuronal, associado a uma redução dos picos dos potenciais de ação. Notou-se também uma redução no número de disparos sincronizados, isto é, picos de potenciais de ação que não eram randômicos ou individuais nas culturas de neurônios TEA. Nos casos de pacientes autistas com haploinsuficiência no gene *SHANK2*, notou-se um aumento do número de sinapses, assim como do tamanho dos dendritos, resultando em hiperconectividade neuronal. Associado a isso notaram aumento da função sináptica excitatória, através de diferenças estatisticamente significantes tanto na frequência quanto na amplitude das correntes excitatórias espontâneas pós-sinápticas (sEPSC).

Por fim, as alterações em canais iônicos constatadas foram: diminuições significativas nas correntes de inativação rápida de  $\text{Na}^+$  e também na de  $\text{K}^+$  ( $\text{Kv}$  tipo A) reguladas por canais dependentes de voltagem em neurônios de pacientes TEA; aumentos significativos na frequência, duração e amplitude das correntes transitórias de  $\text{Ca}^{++}$  em neurônios dos pacientes autistas que portavam deleções no gene *NRXN1 $\alpha$ +/-*, dessa forma promovendo um distúrbio da homeostase desse íon nessas células.

### 5.3.2 Características genótípicas e análise transcriptômica

No geral foram identificados uma série de genes diferencialmente expressos (DEGs) ao se comparar, por RNA-seq. (sequenciamento de RNA), células neuroprogenitoras ou neurônios em diferentes tempos de cultura e estágios de maturação de indivíduos com autismo e controles. Agrupamento hierárquico dos padrões de expressão gênica demonstraram que as amostras de pacientes com TEA se segregaram em um grupo distinto das amostras controle, evidenciando padrões de expressão similares dentro do grupo, porém diferentes comparativamente (Adhya et al., 2020). Análises de ontologia gênica (GO) e *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA) foram aplicadas para evidenciar o significado biológico desses genes com padrões distintos de expressão, demonstrando uma variedade de redes patológicas alteradas em função desses DEGs, sendo em alguns casos concordante com os fenótipos celulares apresentados in vitro. Essas técnicas evidenciaram que os DEGs das células de pacientes com TEA estavam

majoritariamente associados com: desenvolvimento do SNC; comportamento; distúrbios psicológicos; citoesqueleto celular, incluindo a formação e desenvolvimento das sinapses e dos dendritos; diferenciação e proliferação; desenvolvimento e função dos neurônios inibitórios; matriz extracelular; função dos neurotransmissores; regulação da transcrição gênica e atividade de canais iônicos. Dessa forma, todos esses fatores podem apresentar certo nível de disfunção nas NPCs e neurônios dos pacientes com autismo, sendo essa alteração genética substrato para os fenótipos celulares apresentados e, a partir de tal ponto, para o fenótipo clínico do paciente, isto é, sinais e sintomas manifestados.

## 6 DISCUSSÃO

O autismo é considerado um espectro justamente por conta da variabilidade de apresentações clínicas e os graus diferentes de afecção, com maiores ou menores déficits na interação na interação e comunicação social, que por sua vez determinam gravidades diferentes de apresentação do quadro, além das prováveis múltiplas etiologias<sup>13</sup>. Nesse sentido, havia até o DSM-IV a classificação da síndrome de Asperger dentro desse espectro, sendo caracterizada como um autismo de alto funcionamento, posteriormente erradicada no DSM-V<sup>95</sup>. A heterogeneidade sintomática também reflete na heterogeneidade genética desse transtorno, nos quais os casos sindrômicos de TEA (etiologia genética bem definida) representam entre 10-20% dos totais de casos diagnosticados, sendo portanto a maioria dos casos idiopáticos, em que fatores genéticos (mutações de novo, variações no número de cópias) se somam a fatores de risco ambientais para determinar um maior risco de determinado indivíduo desenvolver o transtorno<sup>96</sup>.

Enquanto a etiologia dos casos idiopáticos de autismo permanece obscura, novas abordagens passaram a ser adotadas para investigar mecanismos celulares e moleculares associados com esse transtorno. O uso de células tronco pluripotentes induzidas passou a ser considerada uma alternativa interessante, na medida em que elas mantêm o “background” genético do indivíduo doador, podendo posteriormente serem diferenciadas para múltiplos tipos celulares e analisadas geneticamente e fenotipicamente *in vitro*, sendo portanto modelos interessantes para a análise de patologias complexas com componente hereditário e esporádico<sup>97</sup>.

Na presente revisão sistemática foram incluídos 10 artigos que avaliaram alterações fenotípicas e genotípicas, sendo essa feita especialmente através de análise transcriptômica seguida da busca pelo significado biológico dos genes com padrões diferentes de expressão (IPA, GO ou WGCNA). Tais análises visavam avaliar as diferenças apresentadas entre neurônios derivados de iPSCs de pacientes com TEA e que portanto mantinham o genoma íntegro de tal paciente em comparação com neurônios derivados de iPSCs de indivíduos controle que não apresentavam tal distúrbio. No total foram incluídos 96 participantes, dos quais 46 possuíam o diagnóstico de autismo. As principais comorbidades relatadas foram TDAH, depressão e ansiedade, sendo que outras que apareceram com menor frequência incluíam o transtorno obsessivo compulsivo, a deficiência intelectual, problemas de sono e as convulsões, em linha com as principais comorbidades psiquiátricas e médicas e que costumam estar presentes em cerca de 70% dos pacientes com autismo<sup>98-102</sup>. Quando tais comorbidades

aparecem na infância elas tendem a persistir até a adolescência<sup>103</sup> e, geralmente, quanto mais comorbidades o paciente apresenta, maior será o grau de deficiência e maior será o impacto nas atividades diárias do indivíduo, o que o fará necessitar de maiores níveis de suporte e apoio<sup>100</sup>.

Em termos de fenótipos evidenciados à nível celular, notou-se especialmente uma alteração na formação das rosetas neurais, com anomalias significativas na formação do lúmen dessas estruturas, no estabelecimento da polaridade apico-basal, no diâmetro, bem como um aumento em sua quantidade nas NPCs em diferenciação derivadas de pacientes com TEA. Além disso os estudos evidenciaram distúrbios na diferenciação, maturação e na migração neuronal, assim como na sinaptogênese e nas conexões entre os neurônios de pacientes com autismo. De forma geral, foi encontrado um desbalanço do sistema GABA/glutamatérgico já que havia uma tendência de haver diferenças no destino celular de NPCs TEA em comparação com controles, com uma diferenciação mais guiada para o destino neuronal GABAérgico. Tais fatores indicam que no autismo provavelmente há uma organização atípica das conexões neurais que se manifestam durante a embriogênese do SNC e que persistem durante os estágios iniciais do desenvolvimento<sup>104,105</sup>. Associado a isso foram encontradas disfunções de certos tipos de canais iônicos nos neurônios desses pacientes, particularmente nas correntes de inativação rápida de Na<sup>+</sup> e também na de K<sup>+</sup> (Kv tipo A) reguladas por canais dependentes de voltagem. Tais canais desempenham papéis importantes na dinâmica elétrica dos neurônios, desde a manutenção do potencial de membrana, despolarização e disparo dos potenciais de ação, bem como repolarização celular, sendo tais achados corroborativos com uma alteração da excitabilidade com substrato biológico pautado na disfunção de canais iônicos específicos dos neurônios de pacientes com TEA<sup>106</sup>.

As análises eletrofisiológicas demonstram reduções na complexidade elétrica dinâmica e na atividade elétrica global dos neurônios derivados de pacientes com autismo. Interessantemente, recordações eletroencefalográficas (EEG) de pacientes com autismo também apontaram para uma redução da complexidade desses registros elétricos em comparação com os indivíduos controles<sup>107</sup>. Foram evidenciadas diferenças nos potenciais de ação, na despolarização neuronal e das propriedades de disparo espontâneas desses neurônios em cultura. Tais resultados estão em linha não somente com os distúrbios de excitabilidade demonstrados através da disfunção de canais iônicos específicos, mas também com o desbalanço de sinapses excitatórias e inibitórias, isto é, da diferenciação neuronal GABAérgica e glutamatérgica já supracitada, levando a um déficit pronunciado da conexão em rede desses neurônios, sendo tais fenótipos associados a uma neurogênese anormal (diferenciação desregulada), além de alterações na sinaptogênese e nos graus de maturação desses neurônios.

No que diz respeito aos diferentes padrões de expressão gênica, a análise transcriptômica demonstrou uma série de genes diferencialmente expressos nas células de pacientes com TEA em relação às células controle. Tais padrões de expressão gênica distintas permitiam o agrupamento de neurônios TEA de forma separada dos neurônios de indivíduos não afetados, demonstrando uma tendência de haver padrões de expressão similares entre tais pacientes, porém distintos do grupo controle. Esses padrões distintos de tradução gênica são secundárias a mutações ou alterações epigenéticas do DNA (especialmente metilação do ácido desoxirribonucleico nas regiões promotoras) em genes que, somados, podem conferir um risco poligênico maior do indivíduo de desenvolver TEA. Análises com IPA (Ingenuity Pathway Analysis) e GO (Gene Ontology) e WGCNA (Weighted gene correlation network analysis) foram utilizadas para atribuir significado biológico a tais DEGs, sendo portanto notado que tais genes eram associados a uma série de distúrbios da, maturação, diferenciação e migração neuronal, bem como da formação do citoesqueleto, morfogênese, sinaptogênese, orientação axônica e também da eletrofisiologia neuronal, incluindo disfunções de canais iônicos. Tais achados estiveram em linha com algumas das alterações fenotípicas celulares observadas nessas mesmas pesquisas.

As análises transcriptômicas também demonstraram que neurônios e NPCs derivados de pacientes com autismo apresentavam uma linha de expressão gênica com DEGs já relatados como possivelmente associados a um maior risco de desenvolvimento do transtorno a partir da comparação com outros estudos de associação transcriptômica ampla e bases de dados que mapeiam genes de maior susceptibilidade para o autismo, como a SFARI (<https://gene.sfari.org>). Alguns desses genes incluem: DPP10, CDH10, GABAR3, SCN2A, NRXN3 e SYN3, BCL11B, CACNA1A, ANXA1, FOXP2, ZEB2, ERF, BCL11A, COL2A1, DSCA M, GATA3, TMEM42, KCNS3, MEIS2, PRKAR1B, KIF11, SLC6A1, SPRY2, SATB1 NFIA TBR1, TCF4, KCNJ6 e TRPM3. Além desses, outros genes incluem aqueles associados com a adesão celular (PCDHGA11, PCDH10, CNTN3 e CNTN4), receptores e canais iônicos (CACNA2D3, SCN9A, GRIK3, KCNJ2 e GRIA1) e também com o desenvolvimento do SNC e orientação axônica (ERBB4, TSHZ3, ANXA1 e EBF3). Tanto o gene DPP6 como o gene DPP10 traduzem proteínas que compõem subunidades do canal de potássio dependente de voltagem do tipo A (Kv4), sendo o DPP10 um dos DEGs evidenciados na análise transcriptômica. Notório informar que defeitos nesses tipos de canais já foram implicados na patologia do TEA<sup>108</sup>. Outros DEGs associados com canais iônicos dependentes de voltagem foram KCNIP2, KCNA6, CACNG5 e KCNC2, o que implica ainda mais na disfunção desses

tipos de canais iônicos nos neurônios de pacientes com autismo, possivelmente afetando a transmissão sináptica e a conexão de rede entre os neurônios.

Outra disfunção importante associada ao autismo é o desbalanço GABA/glutamatérgico, isto é, de sinapses excitatórias e inibitórias no SNC<sup>109</sup>. Congruente com tal hipótese, foram identificados padrões alterados de expressão de vários receptores GABAérgicos (GABRB1, GABRA2, GABRQ, GABRG2 e GABRB3). Foi também evidenciado que, no caso da formação exagerada de neurônios GABAérgicos, ela pode estar relacionada com uma expressão aumentada de FOXP1 durante períodos iniciais da embriogênese, levando inclusive a um aumento da proliferação celular associada. Demais genes relacionados com estágios iniciais de diferenciação neuronal também foram regulados positivamente, como no caso de NEUROG3, SOX10 e P2RY2. Em sinergia com esses achados, estudos de pós-morte de cérebros autistas relataram expressão gênica anormal de neurônios corticais inibitórios<sup>110</sup>, o que pode justificar as mudanças fenotípicas evidenciadas nesses tipos celulares. Além disso, reguladores fundamentais dessas vias, como CTNNA1, também conhecido como  $\beta$ -catenina, parecem estar implicadas nas alterações fenotípicas observadas nas NPCs e neurônios de pacientes com TEA. Essa mesma  $\beta$ -catenina, por sua vez, passou a ser considerada uma das mutações *de novo* de risco para desenvolvimento do autismo<sup>111</sup>. Outra via importante desregulada em neurônios de pacientes com autismo foi a Wnt, sendo fundamental na migração neuronal adequada e no controle da proliferação celular. Muitos genes que participam da via de sinalização Wnt apresentavam-se regulados para baixo nos neurônios dos pacientes com esse distúrbio psiquiátrico, incluindo FZD6, além de mutações sem sentido encontradas nos genes DVL2, FRZB e WNT10B.. Vários DEGs apresentavam-se também relacionados com o desenvolvimento cortical fetal, o que está de acordo com a literatura que indica que um dos períodos críticos para desenvolvimento do transtorno do espectro autista é justamente nessa etapa inicial da embriogênese até estágios mais iniciais de desenvolvimento do SNC<sup>112,113</sup>.

Por fim, estes estudos são ainda relevantes na triagem de novos fármacos e terapias para o transtorno do espectro autista, na medida em que esse rastreio de novas drogas é uma das aplicações clássicas de iPSCs e organoides derivados dessas células, visto que é possível avaliar como a substância de interesse interage com a população de célula-alvo, assim como se pode mensurar a toxicidade do agente farmacológico<sup>80,83</sup>. As opções de drogas podem ser tanto estipuladas a partir do conhecimento prévio de um alvo importante para a fisiopatologia da doença de interesse, como através de um “rastreio fenotípico”, ou seja, partindo do fenótipo celular apresentado pelas células aberrantes<sup>83,114</sup>. Os organoides derivados dos pacientes podem



funcionar como ferramentas interessantes para instituição de terapias personalizadas, isto é, analisar qual fármaco possui melhor perfil de efeito para aquele paciente especificamente, considerando nesse caso uma interação farmacogenética<sup>115</sup>. A capacidade de serem criados tanto um organoide afetado pela doença-alvo como um controle isogênico facilita a triagem de drogas que interagem precisamente com o tecido de interesse, ajudando a identificar terapias mais eficazes com menos efeitos colaterais para cada caso<sup>80</sup>. Essas comparações entre vários grupos de iPSCs diferenciadas para o tecido de interesse (afetadas, corrigidas geneticamente e controles não editados) é importante para validar os resultados da triagem dos possíveis novos agentes terapêuticos<sup>116</sup>.

### 6.1 Limitações

Os organoides revolucionaram a forma de abordagem à inúmeras doenças, tornando possível o seu estudo em um ambiente controlado no qual múltiplas variáveis podem ser manipuladas de acordo com o interesse dos pesquisadores. A reprogramação de células somáticas específicas do paciente faz com que elas mantenham o background genético do indivíduo, de forma que se ele possui determinada patologia de interesse, as células podem então se diferenciadas para o tecido e analisadas quanto ao seu fenótipo e genótipo *in vivo*, testadas para a triagem de diversos fármacos, analisando sua tolerabilidade, assim como podem ser transplantadas em modelos de quiméricos através de transplante xenogênicos, na busca de trilhar o caminho rumo à medicina regenerativa, visando o transplante autólogo dessas células.

Apesar de notáveis perspectivas para o futuro, existem limitações evidentes ao se trabalhar com esse tipo de cultura tridimensional. Primeiramente, é necessário mencionar que as patologias ocorrem em um contexto amplo e dinâmico *in vivo*, em que há rica interação com fatores hormonais, imunes, vasculares, matriz extracelular e patógenos variados, isto é, ecossistemas multicelulares complexos e fluidos, de difícil recriação em um ambiente de laboratório<sup>81</sup>. Os organoides são cultivados em ambientes com a presença limitada, se não a ausência completa, desses componentes do estroma, o que faz com que a modelagem de doenças não seja tão verossímil<sup>80</sup>. Dentro desse contexto de modelagem de doenças *in vitro*, dois outros problemas tornam-se salientes: a manutenção de características embrionárias e fetais do tecido alvo, o que limita a transposição do fenótipo observado para doenças de acometimento mais tardio, em que células já diferenciadas ou em processo de senescência seriam a amostra de estudo mais fidedigna e verossímil<sup>81</sup>. Além disso, um outro grande problema é a heterogeneidade das culturas. Clones diferentes de iPSCs de um mesmo indivíduo

não são idênticos. Cada linhagem é diferente em morfologia, curva de crescimento, capacidade de se diferenciar em outros tecidos e expressão gênica, possivelmente por conta de mecanismos epigenéticos associados ao stress da reprogramação. Tais efeitos podem agir como artefatos na modelagem in vitro de patologias, especialmente nos casos em que as iPSCs controles não são apropriadas<sup>45,81</sup>.

Os estudos incluídos nessa presente revisão estão sujeitos a tais limitações associadas ao uso da tecnologia de iPSCs e também organoides. Como foram incluídos apenas casos de autismo idiopático, existe inerentemente uma maior dificuldade de se estabelecer iPSCs controles mais adequadas, visto que não há essa possibilidade palpável de se criar um controle isogênico a partir da edição gênica – por exemplo com CRISPR Cas9 – como nos casos de doenças genéticas ou autismo sindrômico, em que a mutação pode ser corrigida. A criação de linhagens controles isogênicas permite um controle um pouco mais metuculoso da heterogeneidade intrínseca a esse sistema. Portanto, no caso das doenças esporádicas, como o autismo, ainda existe esse desafio de criar iPSCs controles que apenas difiram nas variantes genéticas de risco relevante<sup>83</sup>.

## 7 CONCLUSÃO

A presente revisão sistemática demonstrou que iPSCs diferenciadas para neurônios, neuroprogenitores e organoides cerebrais de pacientes com diagnóstico de autismo possuíam distúrbios fenotípicos variados. Foram majoritariamente destacados alterações na proliferação celular, diferenciação, migração e na formação de rosetas neurais. Além disso, análises eletrofisiológicas demonstraram que tais células possuíam uma dinâmica elétrica deturpada, com alterações nos disparos e picos de potenciais de ação, despolarização e repolarização celular, justificadas por disfunções de tipos específicos de canais iônicos. Por fim, análises transcriptômicas foram performadas e comprovaram que uma série de genes estavam diferencialmente expressos nessas células, genes esses que, muitas vezes, regulavam vias associadas aos fenótipos supracitados, ou seja, as mudanças fenotípicas possuem como substrato biológico a expressão inadequada de diversos genes. Por fim, tais genes também estavam associados com o desenvolvimento adequado do sistema nervoso, o que corrobora com a hipótese que as alterações do cérebro autista têm início no período embriológico do SNC.

Ademais, tais estudos ainda são relevantes na perspectiva de triagem de novas drogas e avaliação de sua tolerabilidade ou toxicidade. Fármacos podem ser testados a partir de alvos moleculares específicos que foram constatados como desregulados ou alterados na patologia em questão, assim como a partir de sua interação com o fenótipo apresentado pelas iPSCs do paciente.

Por fim, cabe ressaltar que ainda existem diversas limitações para o uso e aplicabilidade dessa tecnologia, das quais se destacam: a ausência de estroma (sistema imune, patógenos, vascularização, hormônios e matriz extracelular); a heterogeneidade, visto que cada linhagem de célula possui um padrão de expressão gênica único, além da manutenção de características embrionárias ou fetais.

## REFERÊNCIAS

1. Correia M. O autismo e o atraso global de desenvolvimento - um estudo de caso. Porto; 2013.
2. Muller C, Wagner MB, Calixto AK, Soares LE, Riesgo R dos S. Conhecimentos dos estudantes acerca do autismo em uma universidade do Rio Grande do Sul. Rio Grande do Sul; 2012.
3. Lord C, Brugha TS, Charman T, Cusack J, Dumas G, Frazier T, et al. Autism spectrum disorder. *Nat Rev Dis Prim* [Internet]. 2020;6(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41572-019-0138-4>
4. Bourgeron T. From the genetic architecture to synaptic plasticity in autism spectrum disorder. *Nat Rev Neurosci* [Internet]. 2015;16(9):551–63. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrn3992>
5. Berg JM, Geschwind DH. Autism genetics: searching for specificity and convergence. *Genome Biol*. 2012;13(7):247.
6. O’Roak BJ, Vives L, Girirajan S, Karakoc E, Krumm N, Coe BP, et al. Sporadic autism exomes reveal a highly interconnected protein network of de novo mutations. *Nature* [Internet]. 2012 May 4;485(7397):246–50. Available from: <http://www.nature.com/articles/nature10989>
7. Yeargin-Allsopp M, Rice C, Karapurkar T, Doernberg N, Boyle C, Murphy C. Prevalence of autism in a US metropolitan area. *J Am Med Assoc*. 2003;289(1):49–55.
8. Association AP. MANUAL DIAGNÓSTICO DSM-5.
9. Lord C, Risi S, DiLavore PS, Shulman C, Thurm A, Pickles A. Autism from 2 to 9 years of age. *Arch Gen Psychiatry*. 2006;63(6):694–701.
10. Risi S, Lord C, Gotham K, Corsello C, Chrysler C, Szatmari P, et al. Combining information from multiple sources in the diagnosis of autism spectrum disorders. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* [Internet]. 2006;45(9):1094–103. Available from: <http://dx.doi.org/10.1097/01.chi.0000227880.42780.0e>
11. Lord C, Rutter M, Le Couteur A. Autism Diagnostic Interview-Revised: A revised version of a diagnostic interview for caregivers of individuals with possible pervasive developmental disorders. *J Autism Dev Disord* [Internet]. 1994 Oct;24(5):659–85. Available from: <papers://9813c380-4a5a-426e-ab3b-10e227534cf8/Paper/p696>
12. Esler AN, Bal VH, Guthrie W, Wetherby A, Weismer SE, Lord C. The Autism Diagnostic Observation Schedule, Toddler Module: Standardized Severity Scores. *J*

- Autism Dev Disord. 2015;45(9):2704–20.
13. Lord C, Elsabbagh M, Baird G, Veenstra-Vanderweele J. Autism spectrum disorder. *Lancet* [Internet]. 2018;392(10146):508–20. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31129-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31129-2)
  14. Johnson CP, Myers SM, Lipkin PH, Cartwright JD, Desch LW, Duby JC, et al. Identification and evaluation of children with autism spectrum disorders. *Pediatrics*. 2007;120(5):1183–215.
  15. Fernandez BA, Scherer SW. Syndromic autism spectrum disorders: moving from a clinically defined to a molecularly defined approach. *Dialogues Clin Neurosci* [Internet]. 2017 Dec 31;19(4):353–71. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.31887/DCNS.2017.19.4/sscherer>
  16. Griesi-Oliveira K, Acab A, Gupta AR, Sunaga DY, Chailangkarn T, Nicol X, et al. Modeling non-syndromic autism and the impact of TRPC6 disruption in human neurons. *Mol Psychiatry* [Internet]. 2015 Nov 11;20(11):1350–65. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2018.12.017>
  17. Schubert D, Martens GJM, Kolk SM. Molecular underpinnings of prefrontal cortex development in rodents provide insights into the etiology of neurodevelopmental disorders. *Mol Psychiatry*. 2015;20(7):795–809.
  18. Parikshak NN, Luo R, Zhang A, Won H, Lowe JK, Chandran V, et al. Integrative Functional Genomic Analyses Implicate Specific Molecular Pathways and Circuits in Autism. *Cell* [Internet]. 2013 Nov;155(5):1008–21. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867413013494>
  19. Chow ML, Pramparo T, Winn ME, Barnes CC, Li HR, Weiss L, et al. Age-dependent brain gene expression and copy number anomalies in autism suggest distinct pathological processes at young versus mature ages. *PLoS Genet*. 2012;8(3).
  20. Voineagu I, Wang X, Johnston P, Lowe JK, Tian Y, Horvath S, et al. Transcriptomic analysis of autistic brain reveals convergent molecular pathology. *Nature* [Internet]. 2011 Jun 25;474(7351):380–4. Available from: <http://www.nature.com/articles/nature10110>
  21. Weiss LA, Arking DE, Daly MJ, Chakravarti A, Brune CW, West K, et al. A genome-wide linkage and association scan reveals novel loci for autism. *Nature*. 2009;461(7265):802–8.
  22. Pinto D, Pagnamenta AT, Klei L, Anney R, Merico D, Regan R, et al. Functional impact of global rare copy number variation in autism spectrum disorders. *Nature*

- [Internet]. 2010;466(7304):368–72. Available from:  
<http://dx.doi.org/10.1038/nature09146>
23. Michaelson JJ, Shi Y, Gujral M, Zheng H, Malhotra D, Jin X, et al. Whole-genome sequencing in autism identifies hot spots for de novo germline mutation. *Cell*. 2012;151(7):1431–42.
  24. Betancur C. Etiological heterogeneity in autism spectrum disorders: More than 100 genetic and genomic disorders and still counting. *Brain Res* [Internet]. 2011;1380:42–77. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2010.11.078>
  25. Voineagu I, Wang X, Johnston P, Lowe JK, Tian Y, Horvath S, et al. Transcriptomic analysis of autistic brain reveals convergent molecular pathology. *Nature* [Internet]. 2011;474(7351):380–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nature10110>
  26. Gilman SR, Iossifov I, Levy D, Ronemus M, Wigler M, Vitkup D. Rare De Novo Variants Associated with Autism Implicate a Large Functional Network of Genes Involved in Formation and Function of Synapses. *Neuron* [Internet]. 2011;70(5):898–907. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2011.05.021>
  27. Glessner JT, Wang K, Cai G, Korvatska O, Kim CE, Wood S, et al. Autism genome-wide copy number variation reveals ubiquitin and neuronal genes. *Nature* [Internet]. 2009;459(7246):569–72. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nature07953>
  28. Kaufman MH, Evans MJ. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. 1981;292(9):154–6.
  29. Thomson JA. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* (80-) [Internet]. 1998;282(5391):1145–7. Available from: <http://science.sciencemag.org/>
  30. Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells (embryonic stem cells/inner cell masses/differentiation in vitro/embryonal carcinoma cells/growth factors). Vol. 78, *Developmental Biology*. 1981.
  31. Thomson JA, Marshall VS. 4 Primate Embryonic Stem Cells. *Curr Top Dev Biol*. 1997;38(C):133–65.
  32. Wright WE, Piatyszek MA, Rainey WE, Byrd W, Shay JW. Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. *Dev Genet*. 1996;18(2):173–9.
  33. Zvereva MI, Shcherbakova DM, Dontsova OA. Telomerase: Structure, functions, and activity regulation. *Biochem*. 2010;75(13):1563–83.
  34. Harley CB. Telomere loss: mitotic clock or genetic time bomb? *Mutat Res DNAGing*. 1991;256(2–6):271–82.

35. Harley CB, Vaziri H, Counter CM, Allsopp RC. The telomere hypothesis of cellular aging. *Exp Gerontol.* 1992;27(4):375–82.
36. Wilmut I. © 1997 Nature Publishing Group. *Nature.* 1997;385:810–3.
37. Cowan CA, Atienza J, Melton DA, Eggan K. Developmental Biology: Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells. *Science* (80- ). 2005;309(5739):1369–73.
38. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell.* 2006;126(4):663–76.
39. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell* [Internet]. 2007 Nov [cited 2021 May 2];131(5):861–72. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867407014717>
40. Kawasaki H, Mizuseki K, Nishikawa S, Kaneko S, Kuwana Y, Nakanishi S, et al. Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell-derived inducing activity. *Neuron.* 2000;28(1):31–40.
41. Laflamme MA, Chen KY, Naumova A V., Muskheli V, Fugate JA, Dupras SK, et al. Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts. *Nat Biotechnol.* 2007;25(9):1015–24.
42. Loh YH, Wu Q, Chew JL, Vega VB, Zhang W, Chen X, et al. The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nat Genet.* 2006;38(4):431–40.
43. Boyer LA, Tong IL, Cole MF, Johnstone SE, Levine SS, Zucker JP, et al. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell.* 2005;122(6):947–56.
44. Wang J, Rao S, Chu J, Shen X, Levasseur DN, Theunissen TW, et al. A protein interaction network for pluripotency of embryonic stem cells. *Nature.* 2006;444(7117):364–8.
45. Yamanaka S. Pluripotent Stem Cell-Based Cell Therapy—Promise and Challenges. *Cell Stem Cell* [Internet]. 2020;27(4):523–31. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.stem.2020.09.014>
46. Wang M, Zhang L, Gage FH. Modeling neuropsychiatric disorders using human induced pluripotent stem cells. *Protein Cell* [Internet]. 2020;11(1):45–59. Available from: <https://doi.org/10.1007/s13238-019-0638-8>

47. Russo FB, Brito A, de Freitas AM, Castanha A, de Freitas BC, Beltrão-Braga PCB. The use of iPSC technology for modeling Autism Spectrum Disorders. *Neurobiol Dis* [Internet]. 2019;130(March):104483. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2019.104483>
48. Amir RE, Van Den Veyver IB, Wan M, Tran CQ, Francke U, Zoghbi HY. Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl- CpG-binding protein 2. *Nat Genet*. 1999;23(2):185–8.
49. Marchetto MCN, Carromeu C, Acab A, Yu D, Yeo GW, Mu Y, et al. A model for neural development and treatment of rett syndrome using human induced pluripotent stem cells. *Cell* [Internet]. 2010;143(4):527–39. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2010.10.016>
50. Williams EC, Zhong X, Mohamed A, Li R, Liu Y, Dong Q, et al. Mutant astrocytes differentiated from Rett syndrome patients-specific iPSCs have adverse effects on wildtype neurons. *Hum Mol Genet*. 2014;23(11):2968–80.
51. Muotri AR, Marchetto MCN, Coufal NG, Oefner R, Yeo G, Nakashima K, et al. L1 retrotransposition in neurons is modulated by MeCP2. *Nature* [Internet]. 2010;468(7322):443–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nature09544>
52. Zhang ZN, Freitas BC, Qian H, Lux J, Acab A, Trujillo CA, et al. Layered hydrogels accelerate iPSC-derived neuronal maturation and reveal migration defects caused by MeCP2 dysfunction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(12):3185–90.
53. Trazzi S, De Franceschi M, Fuchs C, Bastianini S, Viggiano R, Lupori L, et al. CDKL5 protein substitution therapy rescues neurological phenotypes of a mouse model of CDKL5 disorder. *Hum Mol Genet* [Internet]. 2018;27(9):1572–92. Available from: <https://academic.oup.com/hmg/article/27/9/1572/4892297>
54. Ricciardi S, Ungaro F, Hambrock M, Rademacher N, Stefanelli G, Brambilla D, et al. CDKL5 ensures excitatory synapse stability by reinforcing NGL-1-PSD95 interaction in the postsynaptic compartment and is impaired in patient iPSC-derived neurons. *Nat Cell Biol* [Internet]. 2012;14(9):911–23. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ncb2566>
55. Amenduni M, De Filippis R, Cheung AYL, Disciglio V, Epistolato MC, Ariani F, et al. IPS cells to model CDKL5-related disorders. *Eur J Hum Genet* [Internet]. 2011;19(12):1246–55. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ejhg.2011.131>
56. Shcheglovitov A, Shcheglovitova O, Yazawa M, Portmann T, Shu R, Sebastiano V, et al. SHANK3 and IGF1 restore synaptic deficits in neurons from 22q13 deletion



- syndrome patients. *Nature* [Internet]. 2013;503(7475):267–71. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nature12618>
57. Gouder L, Vitrac A, Goubran-Botros H, Danckaert A, Tinevez JY, André-Leroux G, et al. Altered spinogenesis in iPSC-derived cortical neurons from patients with autism carrying de novo SHANK3 mutations. *Sci Rep*. 2019;9(1):1–11.
  58. Hernandez RN, Feinberg RL, Vaurio R, Passanante NM, Thompson RE, Kaufmann WE. Autism spectrum disorder in fragile X syndrome: A longitudinal evaluation. *Am J Med Genet Part A*. 2009;149(6):1125–37.
  59. Hagerman RJ, Berry-Kravis E, Hazlett HC, Bailey DB, Moine H, Kooy RF, et al. Fragile X syndrome. *Nat Rev Dis Prim*. 2017;3:17065.
  60. Sheridan SD, Theriault KM, Reis SA, Zhou F, Madison JM, Daheron L, et al. Epigenetic characterization of the FMR1 gene and aberrant neurodevelopment in human induced pluripotent stem cell models of fragile X syndrome. *PLoS One*. 2011;6(10).
  61. Doers ME, Musser MT, Nichol R, Berndt ER, Baker M, Gomez TM, et al. iPSC-derived forebrain neurons from FXS individuals show defects in initial neurite outgrowth. *Stem Cells Dev*. 2014;23(15):1777–87.
  62. Liu J, Kościelska KA, Cao Z, Hulsizer S, Grace N, Mitchell G, et al. Signaling defects in iPSC-derived fragile X premutation neurons. *Hum Mol Genet*. 2012;21(17):3795–805.
  63. Curatolo P, Bombardieri R, Jozwiak S. Tuberous sclerosis. *Lancet*. 2008;372(9639):657–68.
  64. Randle SC. Tuberous sclerosis complex: A review. *Pediatr Ann*. 2017;46(4):e166–71.
  65. Vignoli A, La Briola F, Peron A, Turner K, Vannicola C, Saccani M, et al. Autism spectrum disorder in tuberous sclerosis complex: Searching for risk markers. *Orphanet J Rare Dis* [Internet]. 2015;10(1):1–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s13023-015-0371-1>
  66. Gipson TT. Potential for treatment of severe autism in tuberous sclerosis complex. *World J Clin Pediatr*. 2013;2(3):16.
  67. G. Nadadhur A, Alsaqati M, Gasparotto L, Cornelissen-Steijger P, van Hugte E, Dooves S, et al. Neuron-Glia Interactions Increase Neuronal Phenotypes in Tuberous Sclerosis Complex Patient iPSC-Derived Models. *Stem Cell Reports* [Internet]. 2019;12(1):42–56. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2018.11.019>
  68. Li Y, Cao J, Chen M, Li J, Sun Y, Zhang Y, et al. Abnormal Neural Progenitor Cells

- Differentiated from Induced Pluripotent Stem Cells Partially Mimicked Development of TSC2 Neurological Abnormalities. *Stem Cell Reports* [Internet]. 2017;8(4):883–93. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.02.020>
69. Pópulo H, Lopes JM, Soares P. The mTOR signalling pathway in human cancer. *Int J Mol Sci*. 2012;13(2):1886–918.
  70. Zucco AJ, Pozzo VD, Afinogenova A, Hart RP, Devinsky O, D’Arcangelo G. Neural progenitors derived from Tuberous Sclerosis Complex patients exhibit attenuated PI3K/AKT signaling and delayed neuronal differentiation. *Mol Cell Neurosci* [Internet]. 2018 Oct;92(1):149–63. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1044743118300824>
  71. Bett GC, Lis A, Wersinger SR, Baizer JS, Duffey ME, Rasmuson RL. A Mouse Model of Timothy Syndrome: a Complex Autistic Disorder Resulting from a Point Mutation in Cav1.2. *Am Chinese J Med Sci*. 2012;5(3):135.
  72. Splawski I, Timothy KW, Sharpe LM, Decher N, Kumar P, Bloise R, et al. Ca V 1.2 Calcium Channel Dysfunction Causes a Multisystem Disorder Including Arrhythmia and Autism ultimate signaling molecule for organisms ranging from prokaryotes to humans. In higher organisms, Ca<sup>2+</sup> mediates processes as diverse as synaptic transmiss. *Cell*. 2004;119:19–31.
  73. Paşca SP, Portmann T, Voineagu I, Yazawa M, Shcheglovitov A, Paşca AM, et al. Using iPSC-derived neurons to uncover cellular phenotypes associated with Timothy syndrome. *Nat Med*. 2011;17(12):1657–62.
  74. Krey JF, Paşca SP, Shcheglovitov A, Yazawa M, Schwemberger R, Rasmuson R, et al. Timothy syndrome is associated with activity-dependent dendritic retraction in rodent and human neurons. *Nat Neurosci*. 2013;16(2):201–9.
  75. Birey F, Andersen J, Makinson CD, Islam S, Wei W, Huber N, et al. Assembly of Functional Forebrain Spheroids from Human Pluripotent Cells. *Nature*. 2017;545(7652):54–9.
  76. Peters SU, Beaudet AL, Madduri N, Bacino CA. Autism in Angelman syndrome: Implications for autism research. *Clin Genet*. 2004;66(6):530–6.
  77. Trillingsgaard A, Østergaard JR. Autism in Angelman syndrome: An exploration of comorbidity. *Autism*. 2004;8(2):163–74.
  78. Elena G, Bruna C, Benedetta M, Stefania DC, Giuseppe C. Prader-Willi Syndrome: Clinical aspects. *J Obes*. 2012;2012.
  79. Fink JJ, Robinson TM, Germain ND, Sirois CL, Bolduc KA, Ward AJ, et al. Disrupted

- neuronal maturation in Angelman syndrome-derived induced pluripotent stem cells. *Nat Commun.* 2017;8.
80. Fatehullah A, Tan SH, Barker N. Organoids as an in vitro model of human development and disease. *Nat Cell Biol* [Internet]. 2016;18(3):246–54. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ncb3312>
  81. Rowe RG, Daley GQ. Induced pluripotent stem cells in disease modelling and drug discovery. *Nat Rev Genet* [Internet]. 2019;20(7):377–88. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41576-019-0100-z>
  82. McCauley HA, Wells JM. Pluripotent stem cell-derived organoids: using principles of developmental biology to grow human tissues in a dish. *Development* [Internet]. 2017 Mar 15;144(6):958–62. Available from: <https://journals.biologists.com/dev/article/144/6/958/48346/Pluripotent-stem-cell-derived-organoids-using>
  83. Shi Y, Inoue H, Wu JC, Yamanaka S. Induced pluripotent stem cell technology: A decade of progress. *Nat Rev Drug Discov* [Internet]. 2017;16(2):115–30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrd.2016.245>
  84. Adhya D, Swarup V, Nagy R, Dutan L, Shum C, Valencia-Alarcón EP, et al. Atypical Neurogenesis in Induced Pluripotent Stem Cells From Autistic Individuals. *Biol Psychiatry* [Internet]. 2021;89(5):486–96. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2020.06.014>
  85. Meganathan K, Prakasam R, Baldrige D, Gontarz P, Zhang B, Urano F, et al. Altered neuronal physiology, development, and function associated with a common chromosome 15 duplication involving CHRNA7. *BMC Biol.* 2021;19(1):1–26.
  86. Liu X, Campanac E, Cheung H, Ziats MN, Canterel-Thouennon L, Raygada M, et al. Idiopathic Autism: Cellular and Molecular Phenotypes in Pluripotent Stem Cell-Derived Neurons. *Mol Neurobiol* [Internet]. 2017 Aug 29;54(6):4507–23. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s12035-016-9961-8>
  87. Lewis EMA, Meganathan K, Baldrige D, Gontarz P, Zhang B, Bonni A, et al. Cellular and molecular characterization of multiplex autism in human induced pluripotent stem cell-derived neurons. *Mol Autism.* 2019;10(1):1–23.
  88. Derosa BA, El Hokayem J, Artimovich E, Garcia-Serje C, Phillips AW, Van Booven D, et al. Convergent Pathways in Idiopathic Autism Revealed by Time Course Transcriptomic Analysis of Patient-Derived Neurons. *Sci Rep* [Internet]. 2018;8(1):1–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-26495-1>

89. Amatya DN, Linker SB, Mendes APD, Santos R, Erikson G, Shokhirev MN, et al. Dynamical Electrical Complexity Is Reduced during Neuronal Differentiation in Autism Spectrum Disorder. *Stem Cell Reports* [Internet]. 2019;13(3):474–84. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2019.08.001>
90. Zaslavsky K, Zhang WB, McCready FP, Rodrigues DC, Deneault E, Loo C, et al. SHANK2 mutations associated with autism spectrum disorder cause hyperconnectivity of human neurons. *Nat Neurosci* [Internet]. 2019;22(4):556–64. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41593-019-0365-8>
91. Avazzadeh S, McDonagh K, Reilly J, Wang Y, Boomkamp SD, McInerney V, et al. Increased Ca<sup>2+</sup> signaling in NRXN1 $\alpha$ <sup>+/-</sup> neurons derived from ASD induced pluripotent stem cells. *Mol Autism* [Internet]. 2019 Dec 30;10(1):52. Available from: <https://molecularautism.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13229-019-0303-3>
92. Marchetto MC, Belinson H, Tian Y, Freitas BC, Fu C, Vadodaria KC, et al. Altered proliferation and networks in neural cells derived from idiopathic autistic individuals. *Mol Psychiatry* [Internet]. 2017 Jun 5;22(6):820–35. Available from: <http://www.nature.com/articles/mp201695>
93. Mariani J, Coppola G, Zhang P, Abyzov A, Provini L, Tomasini L, et al. FOXP1-Dependent Dysregulation of GABA/Glutamate Neuron Differentiation in Autism Spectrum Disorders. *Cell* [Internet]. 2015 Jul;162(2):375–90. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S009286741500759X>
94. Sun X, Kaufman PD. Ki-67: more than a proliferation marker. *Chromosoma*. 2018;127(2):175–86.
95. de Giambattista C, Ventura P, Trerotoli P, Margari M, Palumbi R, Margari L. Subtyping the Autism Spectrum Disorder: Comparison of Children with High Functioning Autism and Asperger Syndrome. *J Autism Dev Disord* [Internet]. 2019;49(1):138–50. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s10803-018-3689-4>
96. Muhle R, Trentacoste S V., Rapin I. The Genetics of Autism. *Pediatrics* [Internet]. 2004 May 1;113(5):e472–86. Available from: <https://publications.aap.org/pediatrics/article/113/5/e472/66709/The-Genetics-of-Autism>
97. Freitas BCG, Trujillo CA, Carromeu C, Yusupova M, Herai RH, Muotri AR. Stem cells and modeling of autism spectrum disorders. *Exp Neurol* [Internet]. 2014;260:33–43. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.expneurol.2012.09.017>
98. Hofvander B, Delorme R, Chaste P, Nydén A, Wentz E, Ståhlberg O, et al. Psychiatric

- and psychosocial problems in adults with normal-intelligence autism spectrum disorders. *BMC Psychiatry*. 2009;9:1–9.
99. Simonoff E, Pickles A, Charman T, Chandler S, Loucas T, Baird G. Psychiatric disorders in children with autism spectrum disorders: Prevalence, comorbidity, and associated factors in a population-derived sample. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2008;47(8):921–9.
  100. Mattila ML, Hurtig T, Haapsamo H, Jussila K, Kuusikko-Gauffin S, Kielinen M, et al. Comorbid psychiatric disorders associated with asperger syndrome/high-functioning autism: A community- and clinic-based study. *J Autism Dev Disord*. 2010;40(9):1080–93.
  101. Lugnegård T, Hallerbäck MU, Gillberg C. Personality disorders and autism spectrum disorders: What are the connections? *Compr Psychiatry [Internet]*. 2012;53(4):333–40. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.comppsy.2011.05.014>
  102. Lugnegård T, Hallerbäck MU, Gillberg C. Psychiatric comorbidity in young adults with a clinical diagnosis of Asperger syndrome. *Res Dev Disabil*. 2011;32(5):1910–7.
  103. Simonoff E, Jones CRG, Baird G, Pickles A, Happé F, Charman T. The persistence and stability of psychiatric problems in adolescents with autism spectrum disorders. *J Child Psychol Psychiatry Allied Discip*. 2013;54(2):186–94.
  104. Courchesne E, Mouton PR, Calhoun ME, Semendeferi K, Ahrens-Barbeau C, Hallet MJ, et al. Neuron number and size in prefrontal cortex of children with autism. *JAMA - J Am Med Assoc*. 2011;306(18):2001–10.
  105. Stoner R, Chow ML, Boyle MP, Sunkin SM, Mouton PR, Roy S, et al. Patches of Disorganization in the Neocortex of Children with Autism. *N Engl J Med [Internet]*. 2014 Mar 27;370(13):1209–19. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoal307491>
  106. Schmunk G, Gargus JJ. Channelopathy pathogenesis in autism spectrum disorders. *Front Genet*. 2013;4(NOV):1–20.
  107. Bosl W, Tierney A, Tager-Flusberg H, Nelson C. EEG complexity as a biomarker for autism spectrum disorder risk. *BMC Med*. 2011;9.
  108. Luca G, Ilenio S, Martino C, Luigi C, Fabio F, Maria CD, et al. Update on the implication of potassium channels in autism: K<sup>+</sup> channelautism spectrum disorder. *Front Cell Neurosci*. 2015;9(MAR):1–14.
  109. Coghlan S, Horder J, Inkster B, Mendez MA, Murphy DG, Nutt DJ. GABA system dysfunction in autism and related disorders: From synapse to symptoms. *Neurosci*

- Biobehav Rev [Internet]. 2012;36(9):2044–55. Available from:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.neubiorev.2012.07.005>
110. Wang P, Zhao D, Lachman HM, Zheng D. Enriched expression of genes associated with autism spectrum disorders in human inhibitory neurons. *Transl Psychiatry* [Internet]. 2018;8(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41398-017-0058-6>
  111. O'Roak BJ, Vives L, Girirajan S, Karakoc E, Krumm N, Coe BP, et al. Sporadic autism exomes reveal a highly interconnected protein network of de novo mutations. *Nature* [Internet]. 2012;485(7397):246–50. Available from:  
<http://dx.doi.org/10.1038/nature10989>
  112. Parikshak NN, Luo R, Zhang A, Won H, Lowe JK, Chandran V, et al. Integrative Functional Genomic Analyses Implicate Specific Molecular Pathways and Circuits in Autism. *Cell* [Internet]. 2013 Nov;155(5):1008–21. Available from:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2013.10.031>
  113. Willsey AJ, Sanders SJ, Li M, Dong S, Tebbenkamp AT, Muhle RA, et al. Coexpression Networks Implicate Human Midfetal Deep Cortical Projection Neurons in the Pathogenesis of Autism. *Cell* [Internet]. 2013 Nov;155(5):997–1007. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2013.10.020>
  114. Vincent F, Loria P, Pregel M, Stanton R, Kitching L, Nocka K, et al. Developing predictive assays: The phenotypic screening “rule of 3.” *Sci Transl Med*. 2015;7(293):1–5.
  115. Inoue H, Yamanaka S. The use of induced pluripotent stem cells in drug development. *Clin Pharmacol Ther* [Internet]. 2011;89(5):655–61. Available from:  
<http://dx.doi.org/10.1038/clpt.2011.38/nature06264>
  116. Inoue H, Nagata N, Kurokawa H, Yamanaka S. IPS cells: A game changer for future medicine. *EMBO J*. 2014;33(5):409–17.

## ANEXO A

### Bases de dados pesquisadas e fórmulas de busca

Base de dados	Estratégia de busca	Resultado
Pubmed	("Induced Pluripotent Stem Cells" OR "IPSC" OR "IPS Cells" OR "IPS cell" OR "Cells, IPS" OR "Cell, IPS" OR "Human Induced Pluripotent Stem Cells" OR "hiPSC" OR "Human Induced Pluripotent Stem Cell" OR "neural progenitors" OR "organoids" OR "embryoid bodies" OR "neurospheres") AND ("Autism" OR "Autism Spectrum Disorders" OR "Autistic Spectrum Disorder" OR "Autistic Spectrum Disorders" OR "Disorder, Autistic Spectrum" OR "Rett Syndrome" OR "Infantile Autism") AND ("Disease Modelling" OR "modelling" OR "cellular phenotypes" OR "model") // Years (2010-2021)	209
Science Direct	<b>Find articles with these terms:</b> ("Induced Pluripotent Stem Cells" OR "IPSC" OR "IPS Cells" OR "Human Induced Pluripotent Stem Cells" OR "hiPSC" AND ("Autism" OR "Autism Spectrum Disorders" OR "Autistic Spectrum Disorder" OR "Autistic Spectrum Disorders") + <b>Title, abstract or author specified keywords</b> ("Disease Modelling" OR "modelling" OR "cellular phenotypes" OR "disease model") // Years (2010-2021)	804
ERIC	("Induced Pluripotent Stem Cells" OR "IPSC" OR "IPS Cells" OR "IPS cell" OR "Cells, IPS" OR "Cell, IPS" OR "Human Induced Pluripotent Stem Cells" OR "hiPSC" OR "Human Induced Pluripotent Stem Cell" OR "neural progenitors" OR "organoids") AND ("Autism" OR "Autism Spectrum Disorders" OR "Autistic Spectrum Disorder" OR "Autistic Spectrum Disorders" OR "Disorder, Autistic Spectrum" OR "Rett Syndrome" OR "Infantile Autism") AND ("Disease Modelling" OR "modelling" OR "cellular phenotypes" OR "model")	2
BVS e Scielo	("Célula IPS" OR "Célula-Tronco pluripotente induzida") AND ("Autismo" OR "Transtorno do Espectro Autista")	89