FABIELE BALDINO RUSSO

Geração de células pluripotentes induzidas de pacientes
com transtorno do espectro autista

São Paulo

2015

FABIELE BALDINO RUSSO

Geração de células pluripotentes induzidas de pacientes com transtorno do espectro autista

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:

Cirurgia

Área de concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Prof.^a Dr.^a Patricia Cristina Baleeiro Beltrão
Braga

Co-Orientador:

Prof. Dr. Alysson Renato Muotri

São Paulo
2015

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.3103
FMVZ

Russo, Fabiele Baldino
Geração de células pluripotentes induzidas de pacientes com transtorno do espectro autista /
Fabiele Baldino Russo. -- 2015.
98 f. :il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2015.

Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.
Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Profa. Dra. Patricia Cristina Baleeiro Beltrão Braga.
Co-orientador: Prof. Dr. Alysson Renato Muotri.

1. Transtorno do espectro autista. 2. Transtorno autista. 3. iPSC. 4. Modelagem de doenças.
5. Neurônios. 6. Astrócitos. I. Título.

BIOÉTICA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Geração de células pluripotentes induzidas de pacientes com transtorno autista", protocolado sob o nº 2462/2011, utilizando 10 (dez) camundongos, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Patrícia Cristina Baleeiro Beltrão Braga, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 26/10/2011.

We certify that the Research "Generation of induced pluripotent stem cell from autism spectrum disorder patients", protocol number 2462/2011, utilizing 10 (ten) mice, under the responsibility Profa. Dra. Patrícia Cristina Baleeiro Beltrão Braga, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 10/26/2011.

São Paulo, 29 de janeiro de 2014.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

BIOÉTICA HUMANA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone: (55) (011) 3091.7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

Decl. CEP SH.021 /13.

DECLARAÇÃO

*Em adendo ao PARECER 1001/CEP, de 13 de junho de 2011, declaro que esta Comissão não faz restrições às alterações propostas para o Projeto intitulado: "Reprogramação celular de polpa dentária humana para o estudo dos mecanismos biológicos envolvidos no autismo: projeto a fada do dente" sob responsabilidade dos autores Profa. Dra. **PATRÍCIA CRISTINA BALEIRO BELTRÃO BRAGA** e a aluna **GRACIELA CONCEIÇÃO PIGNATARI**, pois as mesmas não afetam os aspectos éticos da pesquisa.*

São Paulo, 14 de maio de 2013.

Prof. Dr. Paolo M.A. Zanotto
Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB /USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: RUSSO, Fabiele Baldino

Título: Geração de células pluripotentes induzidas de pacientes com Transtorno do espectro autista

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

À minha mãe Leonice, meus irmãos e meu namorado e
companheiro Lenon. Sem o amor, apoio e incentivo de
vocês eu não teria conseguido!

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Pela oportunidade de realização deste curso de pós-graduação.

À Universidade da Califórnia, San Diego - Estados Unidos da América

Pela oportunidade em realizar um estágio pelo período de 1 ano, onde aprendi e cresci muito profissionalmente.

À Prof.^a Dr.^a Patricia Braga (Pati)

Pela orientação, pelos ensinamentos, paciência, disponibilidade e incentivo. Obrigada por confiar no meu trabalho e me proporcionar a experiência de viver em outro país e com isso entender o que é a ciência lá fora. Agradeço pela contribuição no meu crescimento profissional e acima de tudo pela amizade sempre presente. Sou muito grata em ter você como minha orientadora me sinto muito privilegiada por isso.

Ao Prof. Dr. Alysson Renato Muotri

Por abrir as portas do seu laboratório nos EUA. Essa foi a experiência mais importante da minha vida. Aprendi muito. Cresci muito. Obrigada por ser um pesquisador e professor aberto a novas ideias e sempre muito acessível. Não poderia deixar de citar que seu entusiasmo me deu força em muitos momentos difíceis. Obrigada!!!

À Dr.^a Graciela Pignatari (Gra)

Pela indispensável ajuda e participação durante o desenvolvimento do meu doutorado e pelos ensinamentos sempre de grande valia. Você faz parte do meu amadurecimento profissional, aprendi muito com você ao longo desses anos. Te

agradeço acima de tudo pela amizade que sempre levarei comigo. Tenho um carinho enorme por você! Obrigada por tudo!

À Dr.^a Beatriz Freitas (Bia)

Obrigada por me receber de braços abertos na sua casa, no laboratório e acima de tudo por me ensinar tudo que eu precisava aprender para desenvolver esse projeto. Sem você e sua participação com certeza não teria conseguido alcançar todos os resultados que alcancei. Admiro muito você e sua capacidade científica. Além disso obrigada pelo carinho e amizade que conquistamos ao longo desse ano. Obrigada por tudo!

À Prof.^a Dr.^a Maria Angélica Miglino

Pela oportunidade de ingressar na carreira científica e por abrir as portas do departamento para a realização do meu trabalho

Aos pais dos pacientes e pacientes

Que contribuíram com essa pesquisa doando os dentinhos. Sem o apoio de vocês não seria possível.

Aos amigos do laboratório **Marcão, Raphael, Katia, Larissa, Mariah e Cris** por participarem dessa fase da minha vida tão importante. Tenho um carinho enorme por todos vocês.

Aos amigos do laboratório do Professor Alysson **Pinar, Fernanda, Brian, Herai, Jerome, Priscila, Cleber, Helen, Allan, Alexandre, Reneta, Sarah, Leon, Earl e Spencer** por terem me recebido da forma que me receberam sempre com muita atenção e respeito. Thank you!!!

Ao meu grande amigo **João**

Pela amizade sempre presente e pelos bons momentos durante esses anos de convivência.

À amiga **Isabella (Isa)**

Pela ajuda de sempre durante o desenvolvimento dessa pesquisa e acima de tudo pela amizade e carinho!

À minha grande amiga **Dilayla (Di)**

Amiga de outras vidas com certeza. Obrigada pela amizade e carinho durante todos esses anos amiga. Torço e acredito muito em você. Te amodoro muito!!!

Aos meus **amigos e familiares**

Que contribuíram direta e indiretamente para a realização deste trabalho

Aos funcionários da FMVZ/USP **Jaqueline, Rose-Eli, Índio, André e Ronaldo**

Pela ajuda e atenção em todos os momentos que precisei.

Aos professores da FMVZ/USP **Antônio Assis Neto, José Roberto Kfoury Jr e Paula de Carvalho Papa**

Pelos ensinamentos e convivência.

À **FAPESP**

Pelo apoio financeiro. Pelas bolsas de Doutorado e de estágio no exterior (BEPE) que me foram concedidas.

RESUMO

RUSO, F. B. **Geração de células pluripotentes induzidas de pacientes com transtorno do espectro autista**. [Generation of induced pluripotent stem cells from patients with autism spectrum disorder]. 2015. 98 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Transtorno do espectro autista (TEA) é um quadro complexo do neurodesenvolvimento associado com elevado prejuízo funcional, onde os pacientes apresentam alterações comportamentais, déficit de comunicação e problemas de sociabilização. A incidência do TEA é muito elevada e vem crescendo constantemente nos últimos anos. Atualmente a prevalência é de 1 em cada 50 crianças nos EUA, sendo os meninos mais afetados que as meninas (4:1). O diagnóstico dos pacientes com TEA é feito clinicamente e ocorre geralmente com a idade de aproximadamente três anos, idade que os sintomas ficam mais evidentes. As causas biológicas e genéticas do autismo vem sendo estudadas em modelos animais e em material biológico humano, como sangue (genéticas) e cérebro *post-mortem*. Apesar de valiosos, esses modelos não permitem estudos das células neurais humanas em funcionamento. A geração de células neurais funcionais a partir das células previamente reprogramadas mudou esse cenário e abriu portas para gerar modelos celulares e estudar as doenças *in vitro*. Esse trabalho teve como objetivo modelar o TEA *in vitro*, a partir de neurônios e astrócitos derivados de células-tronco pluripotentes induzidas obtidas a partir das células-tronco de dente decíduo esfoliado (SHED) de pacientes com transtorno autista. Em nossos resultados observamos que neurônios autistas apresentam uma significativa diminuição na expressão de genes sinápticos quando comparados com neurônios não-autistas (controle). Além disso, ensaios funcionais de eletrofisiologia revelaram que neurônios autistas têm um número menor de picos de estimulação (*spikes*) por segundo, indicando neurônios possivelmente menos ativos. Em tempo, experimentos de co-cultura de neurônios e astrócitos revelaram que astrócitos autistas podem interferir na maturação e complexidade morfológica dos neurônios controle, e o inverso também foi observado, onde astrócitos de controles podem

resgatar o fenótipo de neurônios autistas, sendo que um aumento significativo no nível de marcadores sinápticos, mudanças na morfologia com neurônios de pacientes mais maduros e complexos foi observado quando cultivados sobre astrócitos controles. Nossos dados indicam que os astrócitos influenciam na maturação, na complexidade e funcionalidade dos neurônios, mostrados aqui pela primeira vez para o autismo idiopático. Além disso, com este trabalho podemos afirmar que é possível modelar o autismo idiopático *in vitro* e estudar formas de resgate fenotípico das células afetadas na patologia visando futuras terapias para esses pacientes. A tecnologia das células reprogramadas e modelagem de doenças abre portas para novas descobertas no campo do autismo.

Palavras-chave: Transtorno do espectro autista, transtorno autista, iPSC, modelagem de doenças, neurônios, astrócitos.

ABSTRACT

RUSO, F. B. **Generation of induced pluripotent stem cells from patients with autism spectrum disorder.** [Geração de células pluripotentes induzidas de pacientes com transtorno do espectro autista]. 2015. 98 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Autism spectrum disorder (ASD) is a group of neurodevelopmental disorders characterized by qualitative impairment communication, social interaction and restricted and repetitive patterns of behavior. The prevalence of 1 in every 50 children in The United States has been reported with a tendency to increase in recent years. Patient ASD diagnosis typically occurs by the age of 3 years and affects more boys than girls (4:1). The biological and genetic causes of autism has been studied in animal models, in human biological material such as blood and in post-mortem brain tissues. Although valuable, these models do not allow study of living human neural cells. The generation of functional neural cells from reprogrammed cells previously changed this scenario and opened doors to generate cellular models *in vitro* and to study diseases as autism. This study aimed to model ASD *in vitro* to study neurons and astrocytes derived from induced pluripotent stem cells from mesenchymal stem cells from dental pulp (SHED) from patients with idiopathic autism. In our results we found that neurons derived from patients with ASD show a significant decrease in synaptic genes compared with controls. Functional electrophysiology tests were performed and we were able to observe a smaller number of spike per second in neurons derived from patients, indicating that neurons from ASD patients has less activity than control neurons. In our co-culture assay between neurons and astrocytes we observed that astrocytes derived from patients may interfere in the maturation and morphological complexity of neurons derived from controls. On the other hand, when we grow ASD neurons on astrocytes from controls we can observe a significant increase in the level of synaptic markers, changes in morphology where we observe more mature and complex neurons. These data indicate that astrocytes influence in the maturity, complexity and functionality of neurons, data never shown before for ASD patients. With these results we can say that it is possible to model

idiopathic autism *in vitro*. The iPSC technology and disease modeling opens doors to new discoveries and therapies for ASD patients.

Keywords: autism spectrum disorder, ASD, iPSC, modeling diseases, neurons, astrocytes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Esquema de modelagem de doenças neurológicas usando a tecnologia de iPSC.....	31
Figura 2 -	Cultivo e caracterização das células-tronco de dente decíduo esfoliado de pacientes com transtorno autista e controles.....	53
Figura 3 -	Geração de células pluripotentes induzidas a partir de células-tronco de dente decíduo esfoliado de pacientes com transtorno autista e controles.....	55
Figura 4 -	Caracterização das iPSC obtidas a partir das células-tronco de dente decíduo esfoliado de pacientes com transtorno autista e controles.....	57
Figura 5 -	Produção de células progenitoras neurais a partir das iPSC dos pacientes com transtorno autista e controles.....	59
Figura 6 -	Caracterização das células progenitoras neurais obtidas a partir das iPSC dos pacientes com transtorno autista e controles.....	60
Figura 7 -	Etapas da diferenciação neuronal à partir das células iPSC dos pacientes com transtorno autista e controles.....	63
Figura 8 -	Caracterização dos neurônios obtidos a partir das iPSC dos pacientes com transtorno autista e controles.....	64
Figura 9 -	Análise dos eventos sinápticos nos neurônios obtidos <i>in vitro</i> dos pacientes com transtorno autista e controles.....	66
Figura 10 -	Análise dos astrócitos obtidos à partir das células iPSC dos pacientes com transtorno autista e controles.....	68
Figura 11 -	Caracterização dos astrócitos obtidos a partir das iPSC dos pacientes com transtorno autista e controles	69
Figura 12 -	Co-cultivo entre neurônios e astrócitos produzidos à partir das iPSC dos pacientes com transtorno autista e controles.....	72
Figura 13 -	Análise do perfil sináptico nas condições de co-cultivo entre neurônios e astrócitos produzidos à partir das células IPS dos pacientes com transtorno autista e controles.....	73
Quadro 1 -	Anticorpos primários utilizados para caracterização celular.....	46
Quadro 2 -	Oligonucleotídeos utilizados para caracterização celular por PCR em tempo real (qPCR).....	48

LISTA DE ABREVIATURAS

AGM - do inglês, *astrocyte growth medium* e do português meio de crescimento de astrócitos

ASD - do inglês, *autism spectrum disorder* e do português transtorno do espectro autista (TEA)

BSA - do inglês, *Bovine Serum Albumin* e do português albumina sérica bovina

BNDF - do inglês, *Brain Derived Neurotrophic Factor*

bFGF-2 - do inglês, *Basic fibroblast growth factor* e do português fator de crescimento de fibroblasto

cDNA – ácido desoxirribonucléico complementar

CO₂- dióxido de carbono

DAPI- 4',6-diamidino-2- phenylindol

DPBS - do inglês, *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline* e do português Dulbecco tampão salina-fostato

DMEM – do inglês, *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DSM - do inglês, *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* e do português *Manual de Estatística e Diagnóstico de Transtornos Mentais*

EB - do inglês, *embryonic body* e do português corpo embrióide

iPSC - do inglês, *induced pluripotent stem cell* e do português células pluripotentes induzidas

KSR - do inglês, *Knockout Serum Replacement*

mL- mililitro

MAP2 - do inglês, *Microtubule-associated protein 2* e do português proteína associada a microtubulos

MEF- do inglês, *Mouse Embryonic Fibroblast* e do português camada de sustentação de fibroblasto

NG - do inglês, *Neural growth (media)*, do português, *meio de crescimento neural*

Nanog- do inglês, *nanog homeobox*, em referência à *Tir Nan Og*

NIH3T3 – do inglês, *fibroblastos de embriões murinos*

NPC - do inglês, *Neural Progenitor Cells* e do português células progenitoras neurais (CPN)

Oct-3/4- do inglês, *octamer 4*

PBS - do inglês, *Phosphate Buffered Saline* e do português tampão salina-fostato

PCR – do inglês, *polymerase chain reaction* e do português reação em cadeia da polimerase

PE - do inglês, *Phycoerythrin* e do português ficoeritrina

PSD-95 - do inglês, *postsynaptic density protein 95*

Ri - inibidor de Rock e do inglês Rock inhibitor

RNA – ácido ribonucléico

rpm - rotações por minuto

SFB - do inglês *Serum fetal bovine* e do português, *Soro Fetal Bovino*

SNC - Sistema nervoso central

TEA - Transtorno do espectro autista – vide também ASD

TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

μl – micro-litros

μM- Micromolar

WT- do inglês, *Wild type* e do português, controle

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	REVISÃO DE LITERATURA	24
2.1	TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA (TEA)	25
2.2	MODELAGEM DE DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS E DO NEURODESENVOLVIMENTO ATRAVÉS DO USO DAS CÉLULAS-TRONCO PLURIPOTENTES INDUZIDAS (IPSC)	28
2.3	MODELANDO O TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA: EVIDÊNCIAS E DESAFIOS	32
3	OBJETIVOS	36
3.1	OBJETIVO GERAL	37
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
4	MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1	COLETA E CULTIVO DAS CÉLULAS-TRONCO DE DENTE DECÍDUO ESFOLIADO DE PACIENTES COM TRANSTORNO AUTISTA E CONTROLES	39
4.2	GERAÇÃO DE CÉLULAS PLURIPOTENTE INDUZIDAS À PARTIR DE CÉLULAS-TRONCO DE DENTE DECÍDUO ESFOLIADO DE PACIENTES COM TRANSTORNO AUTISTA E CONTROLES	40
4.2.1	Manutenção e expansão das iPSC	41
4.3	PRODUÇÃO DE NEURÔNIOS E ASTRÓCITOS DERIVADOS DAS CÉLULAS PLURIPOTENTES INDUZIDAS DE PACIENTES COM TRANSTORNO AUTISTA E CONTROLES	41
4.3.1	Produção de corpos embrióides (EB)	41
4.3.2	Produção de rosetas e células progenitoras neurais (NPC)	42
4.3.3	Geração de neurônios à partir das células iPS dos pacientes com transtorno autista e controles	42
4.3.4	Geração de astrócitos à partir das células iPS dos pacientes com transtorno autista e controles	43
4.3.5	Separação Magnética para enriquecimento neuronal	44
4.3.6	Co-cultivo de astrócitos e neurônios dos pacientes com transtorno autista e controles	44
4.4	CARACTERIZAÇÃO CELULAR E MOLECULAR DAS CÉLULAS	45

4.4.1	Ensaio de imunofluorescência.....	45
4.4.2	Extração de RNA e produção de cDNA.....	47
4.4.3	PCR Quantitativo (qPCR).....	47
4.4.4	Fosfatase Alcalina.....	48
4.4.5	Cariotipagem.....	49
4.4.6	Quantificação de sinapses colocalizadas (<i>Puncta</i>).....	49
4.4.7	Análise funcional das células por eletrofisiologia.....	49
5	RESULTADOS	51
5.1	CULTIVO E CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO DE DENTE DECÍDUO ESFOLIADO DE PACIENTES COM TRANSTORNO AUTISTA E CONTROLES.....	52
5.2	GERAÇÃO DE CÉLULAS PLURIPOTENTES INDUZIDAS A PARTIR DE CÉLULAS-TRONCO DE DENTE DECÍDUO ESFOLIADO DE PACIENTES COM TRANSTORNO AUTISTA E CONTROLES.....	54
5.3	CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS PLURIPOTENTES INDUZIDAS A PARTIR DE CÉLULAS-TRONCO DE DENTE DECÍDUO ESFOLIADO PACIENTES COM TRANSTORNO AUTISTA E CONTROLES.....	56
5.4	OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS PROGENITORAS NEURAIS DE PACIENTES COM TRANSTORNO AUTISTA E CONTROLES.....	58
5.5	OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS NEURÔNIOS DERIVADOS DAS IPSC DE PACIENTES COM TRANSTORNO AUTISTA E CONTROLES.....	61
5.6	ANÁLISE DOS EVENTOS SINÁPTICOS EM NEURÔNIOS OBTIDOS À PARTIR DAS IPSC DE PACIENTES COM TRANSTORNO AUTISTA E CONTROLES.....	65
5.7	OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ASTRÓCITOS OBTIDOS À PARTIR DAS IPSC DE PACIENTES COM TRANSTORNO AUTISTA E CONTROLES	67

5.8	CO-CULTIVO ENTRE NEURÔNIOS E ASTRÓCITOS PRODUZIDOS À PARTIR DAS CÉLULAS IPS DOS PACIENTES COM TRANSTORNO AUTISTA E CONTROLES.....	70
6	DISCUSSÃO.....	74
7	CONCLUSÃO.....	82
	REFERÊNCIAS.....	85

Introdução

1 INTRODUÇÃO

Transtorno do espectro autista (TEA) é um quadro complexo do neurodesenvolvimento associado com elevado prejuízo funcional, onde os pacientes apresentam déficit de comunicação, problemas de sociabilização e alterações comportamentais (ABRAHAMS; GESCHWIND, 2008; GRZADZINSKI et al., 2013; QUAACK et al., 2013; GRIESI-OLIVEIRA et al., 2014). Os pacientes com esse transtorno possuem em comum, principalmente o comprometimento da sociabilidade (KAPLAN et al., 2007; TUCHMAN et al., 2009). O Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais, 5ª Revisão (DSM-V) define o transtorno do espectro autista como uma desordem neurológica com um espectro de prejuízos qualitativos na interação social, na comunicação e padrões restritos e estereotipados de comportamento, interesses e atividades (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013).

A incidência do TEA é muito elevada e vem crescendo constantemente nos últimos anos. Dados mostram que cerca de 1% da população mundial tem TEA (BROEK et al., 2014). Já nos Estados Unidos da América aproximadamente 1 em cada 50 crianças estão dentro do espectro autista (BLUMBERG et al., 2013). O número de meninos afetados é 4x maior que o de meninas (GEIER et al., 2012). No Brasil não há dados do número de pacientes com TEA.

O diagnóstico dos pacientes com TEA ocorre geralmente por volta dos três anos de idade que é quando os sintomas clínicos ficam mais evidentes (GEIER et al., 2012). O interesse em entender melhor essa patologia vem crescendo nos últimos anos e muitos grupos vem estudando o autismo em diferentes segmentos visando compreender melhor seus diversos aspectos. Os dados biológicos e genéticos que se conhecem a respeito do autismo foram feitos através dos raros cérebros *pós-mortem* doados por famílias de pacientes, elucidando a anatomia dos pacientes com TEA (REDCAY; COURCHESNE, 2005; BROEK et al., 2014), ou por amostras de sangue dos pacientes permitindo elucidar causas genéticas envolvidas (STAHL-ZENG et al., 2007) ou ainda, através de modelos animais que apesar das semelhanças, não apresentam a genética humana e não são a ferramenta perfeita para o entendimento do autismo. Por outro lado são organismos completos que

podem ser usados inclusive para teste de fármaco-terapêuticos (TANIA; KHAN; XIA, 2014). Apesar de nenhum dos modelos descritos serem os ideais, são extremamente importantes já que é muito difícil realizar uma biópsia de um tecido cerebral para estudar células neurais vivas dos pacientes.

Com o avanço da ciência, em 2006 foi descrito por Takahashi e Yamanaka uma tecnologia capaz de gerar células-tronco pluripotentes a partir de células somáticas de camundongos, protocolo validado em 2007 para células humanas (TAKAHASHI; YAMANAKA, 2007). Como as células produzidas são pluripotentes, a partir desta importante descoberta abriram-se novas oportunidades para gerar modelos celulares que permitem o estudo de doenças em suas células-alvo, incluindo até o teste de medicamentos específicos *in vitro* (BELTRÃO-BRAGA et al., 2013). Com isso, diversos grupos de pesquisa vem lançando mão dessa tecnologia e seguem estudando doenças neurodegenerativas e do neurodesenvolvimento (DIMOS et al., 2008; EBERT et al., 2009; LEE et al., 2009; MARCHETTO et al., 2010; BRENNAND et al., 2011; SANCHEZ-DANES et al., 2012; IMAIZUMI et al., 2012; KONDO et al., 2013; YU et al., 2014; LI et al., 2015).

Neste trabalho apresentamos uma alternativa para estudar os aspectos neurobiológicos do TEA, analisando neurônios e astrócitos vivos, *in vitro*, derivados de células pluripotentes induzidas obtidas à partir das células-tronco de dente decíduo esfoliado (do inglês, *Stem cell from Human Exfoliated Deciduous teeth*, SHED), extraídas da polpa dentária de pacientes com transtorno autista, também chamado de autismo idiopático ou não-sindrômico.

A tecnologia de reprogramação nos permite aproximar um pouco mais da realidade, estudando aspectos e interações entre células do tecido cerebral vivas desses pacientes. Além disso, a obtenção destas células *in vitro* pode ser usada futuramente para estudos de medicamentos para o autismo.

Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 TRANSTORNOS DO ESPECTRO AUTISTA (TEA)

O autismo foi descrito pela primeira vez por Leo Kanner (1943), médico psiquiatra que após a observação e descrição de indivíduos com distúrbios emocionais, os descreveu como indiferentes a outras pessoas, emocionalmente frios, distanciado e retraídos. No entanto, nos últimos anos essas dificuldades emocionais foram consideradas apenas uma parte dos déficits sociais envolvidos no autismo (RUTTER, 1978; DENCKLA, 1986; FEIN et al., 1986).

O último Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais, 5ª Revisão (DSM-V) define o transtorno do espectro autista como uma desordem neurológica com um espectro de prejuízos qualitativos na interação social, na comunicação e com a presença de padrões restritos e estereotipados de comportamento, interesses e atividades. Nesse Manual as seguintes condições pertencem a este grupo: Transtorno autista, Transtorno de Asperger, Transtorno Desintegrativo da Infância e Transtorno Global do Desenvolvimento sem outra especificação (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013). De forma geral, pacientes com TEA apresentam a tríade de alterações na comunicação, sociabilidade e no comportamento em diferentes graus, que definem o quanto afetado é o paciente (ABRAHAMS; GESCHWIND, 2008; QUAACK et al., 2013; GRIESI-OLIVEIRA et al, 2014). Os pacientes com TEA possuem em comum principalmente o comprometimento da sociabilidade (KAPLAN et al., 2007; TUCHMAN et al., 2009).

De acordo com Geier et al. (2012), o diagnóstico dos pacientes com TEA ocorre geralmente com a idade de aproximadamente três anos e afeta mais meninos (4 meninos para cada menina).

A incidência do TEA é muito elevada e vem crescendo constantemente nos últimos anos, sendo a prevalência dos EUA de atualmente 1 em cada 50 crianças (BLUMBERG et al, 2013). No Brasil não há dados quantificando a prevalência, portanto são usados os dados da prevalência mundial, de aproximadamente 1% da população (MEFFORD et al, 2012; BROEK et al., 2014;), ou seja, é possível que

cerca de 2 milhões de brasileiros possam ter algum grau do TEA (PORTAL BRASIL, 2014).

Além disso, existem diversas doenças genéticas associadas com o autismo como, por exemplo, a Síndrome do X frágil, Síndrome de Angelman, Síndrome de Timothy (BENVENUTO et al., 2009), Síndrome de Rett (MARCHETTO et al., 2010) e Síndrome do Phelan McDermid (PMD5) (SHCHEGLOVITOV et al., 2013), o que pode aumentar ainda mais a incidência.

Fatores ambientais têm sido associados com TEA (GRABUCKER, 2012; KERN et al., 2012; ZEIDAN-CHULIA et al., 2011, 2013). Assim como, a síndrome alcoólica fetal, caracterizada por anomalias mentais e físicas em crianças cujas mães consumiram álcool durante a gravidez, há associação entre a exposição pré-natal ao etanol e uma maior incidência do autismo (NANSON, 1992).

A evidência mais direta ligando fatores ambientais ao autismo está relacionada a exposição a diferentes drogas. Essa exposição gera malformações do desenvolvimento neurológico e maior incidência do autismo. Por exemplo, a exposição do útero ao ácido valproico, fármaco anticonvulsivo foi associada com o fenótipo autista e com desenvolvimento paralelo de anormalidades anatômicas (MOORE et al., 2000; BAMBINI-JUNIOR et al., 2011; BRISTOT SILVESTREIN et al., 2013).

Vários estudos indicaram que elevadas concentrações de partículas do ar poluído podem ter impacto no sistema nervoso central no início da infância e danificar o córtex pré-frontal, resultando em disfunção cognitiva em crianças (CALDERÓN-GARCIDUEN et al., 2008; BLOCK; CALDERÓN-GARCIDUEN, 2009). Diferentes produtos químicos tóxicos, tais como: o cádmio, níquel, mercúrio e o tricloroetileno, além do etanol e do ácido valproico, exercem a sua ação através da neuroglia afetando por exemplo, a captação de glutamato, que é causa primária de toxicidade. A toxicidade tem sido amplamente estudada em doenças neurológicas agudas e crônicas (ESKES et al., 2002; YANG et al., 2007; FERNANDEZ-LIZARBE et al., 2009; GUIZZETTI et al., 2010; LIU et al., 2010; GIBBONS et al., 2011; SCHMIDT et al., 2011; WANG et al., 2011). Com base nesses exemplos, a contribuição potencial de fatores ambientais para o desenvolvimento do autismo pode ser responsável por sua crescente prevalência (MOORE et al., 2000; WALDMAN et al., 2008; BERG, 2009; PALMER et al., 2009; ZEIDAN-CHULIA et al.,

2014). Além disso, há evidências que ligam o impacto das condições ambientais ao estresse oxidativo que pode ser ainda mais exacerbado quando combinado com uma susceptibilidade genética (SAJDEL-SULKOWSKA et al., 2011).

Fatores genéticos também têm sido associada com TEA (GESCHWIND, 2011; STATE; LEVITT, 2011; MEFFORD et al., 2012; DE RUBEIS et al., 2014; IOSSIFOV et al., 2014), no entanto, muitos genes envolvidos no autismo ainda são desconhecidos. Algumas desordens neurológicas e muitas psiquiátricas não ocorrem devido a mutações em um único gene, ao contrário, elas envolvem distúrbios moleculares complexos em múltiplos genes e ainda nos sinais que controlam sua expressão.

Alguns trabalhos identificaram alterações genéticas que poderiam ser possíveis responsáveis pelo autismo, como por exemplo, os genes NRXN1 (KIM et al, 2008) e CNTN4 (ROOHI et al, 2009) além de vários genes de codificação de moléculas de adesão celular neuronal, incluindo NLGN1 e ASTN2, que apresentaram expressão aumentada no sistema nervoso central de pacientes autistas, quando comparados aos controles (GLESSNER, 2009). O gene, SHANK3, relacionado à organização estrutural dos dendritos, também foi encontrado alterado em vários pacientes com TEA sendo que mutações nesse gene resultaram em desordens de comunicação social e linguagem (DURAND et al., 2007).

Ainda, genes relacionados à via de ubiquitina (UBE3A, PARK2, RFWD2 e FBXO40) também se encontravam afetados no SNC de autistas (GLESSNER, 2009). Essas alterações encontradas sugerem uma possível contribuição para o perfil autista. Pesquisas têm demonstrado que os mecanismos epigenéticos complexos estão envolvidos em diversas doenças neurológicas (TSANKOVA et al., 200; GROZEVA et al., 2014; PINTO et al., 2014). Existem evidências que o regulamento epigenético está envolvido na neurogênese, plasticidade neuronal, aprendizagem, memória e em transtornos como depressão, vício, esquizofrenia e disfunção cognitiva. A remodelação da cromatina do promotor *Brain Derivend Neurotrophic Factor* (BDNF) vem sendo associada com a atividade neuronal, convulsões crônicas, vício em cocaína e Síndrome de Rett (TSANKOVA et al., 2007). Recentemente foi descrito um novo gene responsável por regulamento epigenético, o SETD5, que está envolvido com deficiência intelectual e ao autismo (GROZEVA et al., 2014; PINTO et al., 2014).

Diversos estudos com bases genética envolvidas no autismo vem sendo realizados e recentemente um importante estudo foi publicado na revista Nature onde foram descritos 33 genes relacionados com o autismo. Apesar de aparentemente novos, 15 desses genes já eram conhecidos e associados ao autismo (ANK2, ARID1B, CHD8, CUL3, DYRK1A, GRIN2B, KATNAL2, POGZ, SCN2A, SYMGABI, TBR1, ASXL3, PTEN, RELN, MYT1L), 11 genes foram relatados anteriormente com mutações em pacientes com TEA, mas não foram classificados como genes de risco real (SUV420H1, ADNP, BCL11A, CACNA2D3, CTTNBP2, GABRB3, CD42BPB, APH1A, NR3C2, SETD5 e TRIO), devido à insuficiência de provas, e apenas 7 genes são completamente novos (ASH1L, MLL3, ETV6, NAA15, MYO9B, MIB1 e VIL1) (DE RUBEIS et al., 2014).

Apesar da literatura nos relatar que o autismo tem fatores genéticos envolvidos, os mecanismos celulares e moleculares permanecem ainda desconhecidos e, com isso, o interesse em entender melhor essa doença que afeta tantas crianças vem crescendo muito nos últimos anos.

2.2 MODELAGEM DE DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS E DO NEURODESENVOLVIMENTO ATRAVÉS DO USO DAS CÉLULAS-TRONCO PLURIPOTENTES INDUZIDAS (IPSC)

A tecnologia de reprogramação celular capaz de gerar células-tronco pluripotentes induzidas (*induced pluripotent stem cell* - iPSC) a partir de células somáticas usando a combinação de 4 genes específicos foi descrita por Takahashi e Yamanaka em 2006 para fibroblastos murinos e em 2007 fibroblastos humanos, onde, através do uso de vetores retrovirais, genes expressos somente na fase embrionária foram novamente expressos em células adultas, fazendo com que as células reprogramassem e voltassem a se comportar como na fase embrionária (Takahashi; Yamanaka, 2007).

A reprogramação celular abriu portas para gerar modelos celulares e estudar doenças *in vitro*. As iPSC oferecem a oportunidade de gerar células de linhagem específicas envolvidas em diversas doenças, podendo auxiliar na compreensão dos

mecanismos biológicos de diversos transtornos como, por exemplo, o autismo (BELTRÃO-BRAGA et al., 2013). Talvez ainda o mais importante, seja o fato de que essas células possuem o mesmo material genético das células originais, ampliando o seu uso para modelar doenças genéticas (MARCHETTO et al., 2008; BELTRÃO-BRAGA et al., 2011).

Cientistas do mundo inteiro vem estudando diferentes doenças *in vitro*, principalmente doenças neurológicas a partir da produção de células neurais no laboratório. Além disso, a reprogramação celular abre novas perspectivas para testes de fármaco-terapêuticos e ainda uma eventual aplicação futura das células em terapias autólogas.

Doenças neurodegenerativas ocorrem como resultado de processos neurodegenerativos, incluindo a perda crônica e progressiva da estrutura ou função dos neurônios (XIE; ZHANG, 2015).

A primeira vez que neurônios foram diferenciados a partir de iPSC foi em pacientes com esclerose lateral amiotrófica (ELA), doença onde ocorre degeneração de neurônios motores (DIMOS et al., 2008). Seguindo este conceito, em 2009, células de pacientes com atrofia muscular espinhal foram reprogramadas em iPSC e a partir dessas células reprogramadas, foram produzidos neurônios motores *in vitro*, sendo essa a primeira vez que foi demonstrada a prova do princípio que as células iPSC podem ser utilizadas para modelar doenças genéticas (EBERT et al., 2009). Apesar da obtenção de neurônios já ter sido relatada anteriormente (DIMOS et al., 2008) foi apenas neste trabalho que os neurônios obtidos a partir das células reprogramadas foram analisados.

Neste mesmo ano, Lee et al. (2009) derivaram células iPSC de pacientes com disautonomia familiar, uma neuropatia rara, mas fatal. A doença é caracterizada pelo esgotamento de neurônios autônomos e sensoriais. Os mecanismos dessa doença são mal compreendidos devido a falta de um modelo de estudo adequado e a reprogramação celular permitiu a obtenção de um modelo mais próximo da realidade, onde a partir da análise da expressão gênica de células derivadas dos três folhetos embrionários, os autores observaram a baixa expressão de precursores específicos de crista neural, revelando ser esse o possível mecanismo envolvido na doença. Sendo assim, a reprogramação celular é uma boa alternativa para modelar doenças e desvendar os mecanismos biológicos implicados nelas.

Um trabalho realizado em 2010 com células de pacientes com síndrome de Rett revelou mais uma faceta importante do uso da modelagem de doenças usando a reprogramação celular. Os pesquisadores reprogramaram células, diferenciaram em neurônios e então testaram pela primeira vez a ação de fármacos nos neurônios *in vitro*, achando dois que reverteram o fenótipo alterado da doença, abrindo assim novas perspectivas de tratamento para a Síndrome de Rett (MARCHETTO et al., 2010). Dessa forma, este estudo ilustrou a promessa da tecnologia de iPSC para ganhar novos *insights* sobre a patogênese de doenças humanas.

A partir destes trabalhos pioneiros que mostraram aplicações importantes da modelagem de doenças para patologias que acometem o sistema nervoso, vários outros têm surgido, como a modelagem para atrofia muscular espinhal, um dos mais comuns distúrbios autossômicos recessivos nos seres humanos causador de mortalidade infantil (CHANG et al., 2011), para a esquizofrenia, desordem neurológica debilitante com prevalência mundial de 1% (BRENNAND et al., 2011; YU et al., 2014), para a doença de Huntington, doença neurodegenerativa progressiva genética associada com deficiência motora e sintomas psiquiátricos causado por excessivas expansões trinucleotídeos CAG no gene Huntingtina (HTT) (ZHANG et al., 2010; HA; FUNG, 2012), para doença de Parkinson (DP), forma mais comum dos distúrbios neurodegenerativos progressivos do movimento com prevalência de cerca de 100-300 em cada 100.000 indivíduos (LEES; HARDY; REVESZ, 2009; SANCHEZ-DANES et al., 2012; IMAIZUMI et al., 2012); para a doença de Alzheimer, causada pela degeneração progressiva e a perda de neurônios e sinápses em todo o cérebro (BALLARD et al., 2011; KONDO et al., 2013); entre outras patologias menos frequentes na população mundial.

A modelagem de doenças através das iPSC é uma excelente ferramenta para o estudo dos mecanismos envolvidos em doenças em geral, mas principalmente para doenças neuronais, uma vez que a coleta de tecido cerebral é dificultada e o acesso a células neuronais vivas é restrito ou proibitivo. Além disso, o uso das células reprogramadas do próprio paciente permite manter a base genética celular, o que é especialmente interessante quando pouco se sabe sobre a causa da doença e também permite pensar em medicina personalizada, onde o medicamento é utilizado de acordo com a necessidade individual do pacientes. Podemos observar essa logística na figura 1.

Figura 1 - Esquema de modelagem de doenças neurológicas usando a tecnologia de iPSC

Fonte: (MARCHETTO et al., 2010, adaptado por RUSSO, 2014)

Legenda: Esquema ilustrativo da reprogramação de células somáticas de pacientes e controles, gerando células pluripotentes induzidas (iPSC) isogênicas, ou seja, com o mesmo material genético do paciente. A partir das iPSC, as células progenitoras neurais são produzidas e diferenciadas em diferentes tipos de neurônios ou células da glia. Fenótipo celular e conexões nervosas são estudados *in vitro* assim como, interação entre diferentes células, como os neurônios e astrócitos em co-cultivo. Após a identificação do fenótipo, plataformas podem ser testadas para triagem de fármacos visando novas terapias para o paciente.

2.3 MODELANDO O TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA: EVIDÊNCIAS E DESAFIOS

O autismo é considerado como uma disfunção cerebral, com pacientes manifestando convulsões em 33% dos casos e retardo mental em 70% dos casos (QI menor que 70) (GILBERT; COLEMAN, 1996). Estudos sugerem que o TEA é caracterizado pela perda de células neuronais (COURCHESNE et al., 2007), mas poucos detalhes se tem em relação a isso.

A modelagem do autismo a partir de células iPSC é uma estratégia muito interessante para estudar uma patologia que afeta tantas crianças e cujo interesse científico vem aumentando. Como o TEA é uma patologia cuja manifestação clínica está relacionada ao sistema nervoso central, este seria o tecido alvo para estudar o autismo.

Estudos de pacientes com TEA foram realizados através de cérebros doados *pós-mortem* (FERNER, 2008; VOINEAGU, et al., 2011). Diversas alterações na formação e maturação das espinhas dendríticas e anormalidades sinápticas também tem sido relatadas em estudos *pós-mortem* de pacientes com síndromes relacionadas ao autismo como a Síndrome de Angelman, Síndrome de Timothy e Síndrome de Rett. Essas alterações também foram observadas em modelo animais dessas síndromes (PHILLIPS; POZZO-MILLER, 2015). Entretanto, os resultados obtidos através desse tecido neuronal são na maioria das vezes relacionados ao estágio final da doença (KIM; WEBSTER, 2009). Somado a isso, o tecido está morto e fixado, impedindo investigações acerca do funcionamento em tempo real. Estudos nos cérebros em funcionamento são muito dificultados pelo fato de que biópsias do sistema nervoso central são muito raras, já que a biópsia é um procedimento muito invasivo, portanto esses estudos ficam restringidos a exames de imagem (ASSAF et al., 2010; WEE et al., 2014). A incapacidade em estudar o cérebro vivo dos pacientes limita o nosso conhecimento das doenças que afetam o sistema nervoso, como é o caso do autismo.

Atualmente com a tecnologia das células reprogramadas conseguimos nos aproximar um pouco mais de um modelo ideal de estudo para o TEA, onde podemos estudar os neurônios e outras células vivas do sistema nervoso dos pacientes *in vitro*

e com isso, entender melhor os mecanismos envolvidos nesse transtorno (BELTRÃO-BRAGA et al., 2013). Sendo assim, as iPSC representam uma incrível oportunidade para a modelagem do TEA (ROSS; ELLIS, 2010, BELTRÃO-BRAGA et al., 2013).

Entretanto, até poucos anos atrás, neurônios derivados de iPSC foram gerados a partir de pacientes com TEA, mas sem a realização de ensaios funcionais que pudessem trazer novas informações (DE ROSA et al., 2012). Atualmente, a obtenção de neurônios funcionais está bem estabelecida. No entanto, o estudo da interação de células neuronais traria mais informações e melhor elucidação dessa patologia.

Protocolos para derivar neurônios à partir das células iPS têm sido aplicados para gerar neurônios personalizados de indivíduos com transtornos neurológicos sindrômicos que compartilham algumas características autísticas, como por exemplo a Síndrome de Rett (MARCHETTO et al., 2010; CHEUNG et al., 2011), Síndrome do X-Frágil (URBACH et al., 2010), Síndrome de Angelman (CHAMBERLAIN et al., 2010), Síndrome de Timothy (PASÇA et al., 2011) e Síndrome do Phelan McDermid (PMDS) (SHCHEGLOVITOV et al., 2013). Estes trabalhos revelaram fenótipos neuronais específicos da doença, incluindo a conectividade sináptica disfuncional. No entanto, esta abordagem deveria ser aplicada diretamente para o estudo do TEA, pois, a quinta edição do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais exclui indivíduos com transtornos do desenvolvimento neurológico sindrômicos de um diagnóstico de TEA (KIM et al., 2014).

Recentemente foi publicado, um estudo que gerou o primeiro modelo a partir de iPSC para estudar o autismo não sindrômico ou idiopático. Nesse estudo os fenótipos celulares e moleculares foram investigados a partir de neurônios derivados de iPSC de um paciente com uma mutação no gene TRPC6, que atua em um canal de cálcio no cérebro, controlando o funcionamento dos neurônios, em particular, das sinapses neuronais (GRIESI-OLIVEIRA et al., 2014). Além da análise *in vitro*, os autores confirmaram que essa mutação leva à redução de sinapses e alterações morfológicas nos neurônios de camundongos. Estes dados demonstraram fenótipos em comum com os trabalhos citados acima sobre transtornos sindrômicos, onde todas estas perturbações demonstraram anormalidades neuronais, tais como morfologia alterada e défices sinápticos. Este estudo trouxe informações valiosas

para o conhecimento do transtorno autista ou autismo idiopático, porém essa mutação ocorre em menos de 1% dos pacientes com TEA e como sabemos a genética do autismo é bastante complexa e envolve diversos genes (DE RUBEIS et al., 2014). Com isso, podemos dizer que a modelagem do transtorno autista através das iPSC pode contribuir muito para o melhor entendimento dessa patologia.

Apesar de evidências de alterações neuronais e disfunção sináptica em autistas terem sido relatadas nos últimos anos, estudos *pós-mortem* mostraram disfunções microgliais e astrocíticas em pacientes com TEA (EDMONSON et al., 2014). Com novos dados surgindo em relação a importância das células gliais em diversas patologias nas últimas décadas, um crescimento exponencial no conhecimento das funções do SNC vem ocorrendo e, conseqüentemente, grupos de cientistas têm se empenhado em desenvolver protocolos para produção de células da glia *in vitro*, como os astrócitos que são considerados células-chaves na fisiologia desse sistema (ZEIDAN-CHULIA et al., 2014).

Os astrócitos são as células da neuroglia mais abundantes do SNC, sendo representados por dois tipos celulares: os astrócitos protoplasmáticos (predominante na substância cinzenta) e os astrócitos fibrosos (predominante na substância branca). Essas células exercem muitas funções como por exemplo: controle da neurogênese, suporte na sinaptogênese, manutenção das sinapses, participação na neurotransmissão no suporte, nutrição dos neurônios, desenvolvimento do sistema nervoso, entre outras (ZHANG; BARRES, 2010; COLANGELO et al., 2014; PEKNY et al., 2014).

Os astrócitos são muitas vezes fornecidos durante a maturação dos neurônios uma vez que promovem sinaptogênese (JOHNSON et al., 2007). No córtex humano, um único astrócito pode conter até 2.000 mil sinapses neuronais (OBERHEIM et al., 2009). A complexidade da interação entre astrócitos e os elementos celulares dentro de seu raio de ação é realmente enorme (MATYASH; KETTENMANN, 2010).

Estudos que caracterizam essas células em termos moleculares estão em andamento o que irá ajudar na classificação funcional dos astrócitos e conseqüentemente aumentar a compreensão do seu papel na patogênese de diversas doenças, incluindo o autismo (ZEIDAN-CHULIA et al., 2014), uma vez que outras doenças neurológicas pediátricas já foram relacionadas a uma desregulação

nos astrócitos, como a leucodistrofia e a epilepsia (CHABOUB; DENEEN, 2013; FRICK et al., 2013).

Astrócitos derivados de iPSC de pacientes com Síndrome de Rett foram produzidos recentemente e mostraram que afetam a função dos neurônios derivados dos pacientes controles através de ensaios de co-cultivo entre neurônios e glia. Esse trabalho reforça a tese de que os astrócitos podem influenciar na funcionalidade neuronal (WILLIAMS et al., 2014). Há uma crescente evidência da contribuição astrogliar na evolução de anormalidades estruturais e funcionais em cérebros de pacientes com autismo (WILLIAMS et al., 2014).

A disponibilidade de protocolos para a geração de astrócitos derivados de iPSC nos permite realizar experiências *in vitro* e estudar as células vivas e suas funcionalidades. Além disso, experiência de co-cultivo entre astrócitos e neurônios podem ser realizados para examinar o papel da glia na disfunção neuronal associada com diversas doenças, incluindo o autismo. Essa tecnologia poderá nos fornecer pistas relacionadas ao desenvolvimento desta doença e contribuir assim para novas abordagens terapêuticas.

Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve como objetivo produzir células pluripotentes induzidas (iPSC) de pacientes com transtorno do espectro autista (TEA) e sem autismo (aqui denominados como controles - WT) a partir de células-tronco de dente decíduo esfoliado (SHED) e diferenciá-las em células neuronais para estudar características celulares, moleculares e funcionais dessas células.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Coleta e cultivo das SHED de 3 pacientes com transtorno autista e de 3 controles;
- Reprogramação celular e obtenção de iPSC derivadas das SHED de pacientes com transtorno autista e controles;
- Análise morfológica e molecular das iPSC geradas a partir das SHED de pacientes com transtorno autista e controles;
- Diferenciação neuronal, caracterização e análise dos fenótipos dos neurônios obtidos dos pacientes com transtorno autista e controles;
- Produção e caracterização dos astrócitos obtidos dos pacientes com transtorno autista e controles;
- Estabelecimento de co-cultura entre neurônios e astrócitos derivados de pacientes com transtorno autista e controles;
- Análise da interação e influência dos astrócitos nos neurônios dos pacientes com transtorno autista e controles.

Material e Método

4 MATERIAL E MÉTODO

Para a realização deste projeto, alguns métodos foram seguidos conforme os protocolos descritos a seguir.

4.1 COLETA E CULTIVO DAS CÉLULAS-TRONCO DE DENTE DECÍDUO ESFOLIADO DE PACIENTES COM TRANSTORNO AUTISTA E CONTROLES

Após aprovação pelo Comitê de Ética em pesquisas em seres humanos do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de São Paulo (Protocolo nº1001) e pelo Comitê de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da mesma Universidade (Protocolo Nº2462/2011), as amostras de dentes decíduos foram coletadas a partir de doadores voluntários após informe e consentimento do doador, mediante ciência e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Os dentes decíduos de 3 pacientes com transtorno autista, que apresentam comprometimento na fala, estereotipia e pouca agressividade de 3 pacientes sem TEA (denominados de controles) foram doados após sua queda espontânea ao “Projeto A Fada do Dente”. Posteriormente a queda, o dente foi transportado em temperatura adequada em caixa hermética com gelo mantendo uma temperatura em torno de 4°C usando meio de transporte contendo DMEM (LGC Biotecnologia, São Paulo, Brasil) e 5% de solução de antibiótico-antifúngico (500U/mL penicilina, 500µg/mL estreptomicina e 2,5µg/mL anfotericina – Sigma, SL, USA) e 5% de soro fetal bovino (SFB) comum (Life Technologies, CA, USA). Os dentes foram enviados para o processamento no Laboratório de Células-Tronco (LCT) do Departamento de Cirurgia da FMVZ/USP.

Para o isolamento, as células-tronco de dente decíduo esfoliado (do inglês *stem cell from human exfoliated deciduous teeth*, SHED), foram extraídas a partir do método de digestão enzimática utilizando a Colagenase tipo I (Life Technologies).

Para isso, os dentes foram lavados 3x com PBS contendo 5% de solução de antibiótico-antifúngico (penicilina/estreptomicina/anfotericina – Sigma-Aldrich). Após esse procedimento, as polpas foram retiradas com auxílio de uma agulha (22G – BD Bioscience, NJ, USA)), foram colocadas em um tubo contendo 1mL de collagenase (3mg/mL) e deixadas em banho maria a 37 °C por 40 minutos. Após esse procedimento a collagenase foi inativada, as células centrifugadas e colocadas em cultivo. O meio de cultura utilizado foi composto por DMEM-F12 contendo 10% de SFB comum, 1% da solução de antibiótico-antifúngico (100U/mL penicilina, 100µg/mL estreptomicina e 0,5µg/mL anfotericina – Sigma, SL, USA Sigma-Aldrich), 1% de L-glutamina (Life Technologies) e 1% de aminoácidos não essenciais (MEM NEAA - Life Technologies). Todas as culturas utilizadas neste trabalho foram sempre mantidas a 37 °C sob atmosfera úmida contendo 5% de CO₂.

4.2 GERAÇÃO DE CÉLULAS PLURIPOTENTE INDUZIDAS À PARTIR DE CÉLULAS-TRONCO DE DENTE DECÍDUO ESFOLIADO DE PACIENTES COM TRANSTORNO AUTISTA E CONTROLES

As SHED foram plaqueadas na concentração de 1×10^5 em placas de 6 orifícios e após 24 horas foram submetidas a transdução utilizando virus Sendai (CytoTune® - Life Technologies) carregando os “4 fatores de Yamanaka” (Oct4, Sox2, Klf4 and c-Myc). Após incubação de 24 horas, o meio foi trocado por meio DMEM-F12 contendo 10% de SFB e 1% de solução de antibiótico-antifúngico (100U/mL penicilina, 100µg/mL estreptomicina e 0,5µg/mL anfotericina – Sigma), 1% de L-glutamina (Life Technologies) e 1% de aminoácidos não essenciais (Life Technologies). As células foram mantidas 48 horas para descanso e recuperação. Após este período, as células foram repicadas com tripsina e em seguida, foram plaqueadas sobre uma camada de células de sustentação, denominadas de MEF (do inglês, *Mouse Embryonic Fibroblast*) inativadas com 10µg/mL mitomicina C (Global Stem, MD, USA) em meio de células alvo, ou seja das SHED. O meio das MEF foi o mesmo das células em reprogramação e, após 24 horas, o meio foi substituído por meio embrionário (DMEM/F12 glutamax (Life Technologies), 20%

KSR (*Knockout Serum Replacement* -Life Technologies), 2mM de aminoácidos não essenciais, 100 μ M beta-mercaptoetanol (Life Technologies) e 30ng/mL de fator de crescimento de fibroblasto 2 (bFGF-2 - Life Technologies), sendo esse último adicionado diariamente.

As células foram mantidas sobre MEF até o aparecimento das primeiras colônias de iPSC. Após esse período, as colônias foram cultivadas sobre uma matriz celular (Matrigel, BD Bioscience, NJ, USA) plaqueada sobre a placa de cultura de plástico, condição considerada “livres de MEF” (do inglês *feeder free*) e alimentadas com meio de cultura mTeSR (Stem Cell Technologies, YVR, Canadá), sendo este último trocado diariamente. As colônias de iPSC foram repicadas conforme a sua necessidade com as mesmas condições mencionadas.

4.2.1 Manutenção e expansão das iPSC

A manutenção das células iPSC foi realizada diariamente com a troca do meio de cultura mTeSR (Stem Cell Technologies) e a expansão dessas células foi feita de acordo com a necessidade, para a realização dos experimentos. De modo geral, as células foram mantidas em placas tratadas com Matrigel (BD Biosciences) em condições *feeder free*.

4.3 PRODUÇÃO DE NEURÔNIOS E ASTRÓCITOS DERIVADOS DAS CÉLULAS PLURIPOTENTES INDUZIDAS DE PACIENTES COM TRANSTORNO AUTISTA E CONTROLES

4.3.1 Produção de corpos embrióides (EB)

As colônias de iPSC foram plaqueadas no Matrigel (BD Biosciences) e mantidas por 5 dias no meio mTSeR (Stem Cell Technologies). No quinto dia, o meio foi

trocado por meio N2 (DMEM/F12 suplementado com N2 1x (Invitrogen) contendo 1 μ M de dorsomorfina (Tocris, Ellisville, MO, USA) e 10 μ M de SB431542 (Stemgent, Massachusetts, USA) por 48 horas. Após dois dias nessas condições, as colônias foram removidas da placa e cultivadas em suspensão como EB (do inglês *embryoid bodies*, EB) por 5 dias em rotação constante de 90 rpm em meio N2.

4.3.2 Produção de rosetas e células progenitoras neurais (NPC)

Para obtenção das rosetas, os EB obtidos foram coletados, transferidos para uma nova placa tratada com Matrigel (BD Biosciences) para adesão, e mantidos com meio NGF (DMEM/F12 (Life Technologies) suplementado com 0,5x N2 (Life Technologies) 0,5x Gem21 (Gemini Bio-products, CA, USA), 20ng/mL de bFGF-2 (Life Technologies) e 1% penicilina/estreptomicina (Sigma-Aldrich). Os EB aderem rapidamente ao Matrigel (BD Biosciences) e as rosetas se formam cerca de 48 horas após a adesão. As rosetas foram monitoradas diariamente para avaliar o momento adequado da coleta das células progenitoras neurais (do inglês, *Neural Progenitor Cells*, NPC), que crescem no interior das rosetas. As rosetas foram coletadas manualmente utilizando o microscópio EVOS (Life Technologies), dissociadas suavemente e plaqueadas em placas revestidas com 10 μ g/mL poliornitina (Sigma-Aldrich) em plástico e 1 μ g/mL para o vidro, e revestida com 2,5 μ g/mL de laminina (Life Technologies) em plástico e 5 μ g/mL para as superfícies de vidro. Esta população de NPC foi expandida usando o meio de cultura NGF como descrito acima.

4.3.3 Geração de neurônios à partir das células iPS de pacientes com transtorno autista e controles

Para diferenciar as NPC em neurônios, uma placa de 100mm com aproximadamente 70% de confluência foi tratada com 10mM de inibidor de Rock

(Y-27632, Calbiochem - Millipore, DA, Germany) em meio NG na ausência de b-FGF2. As células foram mantidas nesse meio por 48 horas e, então, o meio foi novamente substituído por somente meio NG. Esse meio, sem b-FGF2 e inibidor de Rock foi mantido por 4 semanas sendo trocado a cada 3-5 dias, período considerado suficiente para a diferenciação neuronal. As células foram monitoradas diariamente por microscópio óptico procurando verificar a morfologia característica de neurônios.

4.3.4 Geração de astrócitos à partir das células iPS de pacientes com transtorno autista e controles

As NPC foram derivadas das iPSC e cultivadas como descrito anteriormente em placas de 100mm de diâmetro. Quando atingiram uma confluência de aproximadamente 90%, o protocolo de produção de astrócitos foi iniciado. Para isso, as células foram incubadas com dPBS (Life Technologies) a 37 °C durante 5 minutos. Em seguida, as células foram raspadas para formar neuroesferas utilizando 9 mL de meio NGF. As células foram dissociadas por pipetagem suave e distribuídos em 3 mL por poço numa placa de seis poços e mantidas em agitação constante (90 rpm). O meio foi trocado no dia seguinte.

Após formação das neuroesferas, o FGF foi removido e o Inibidor da Rock foi adicionado a uma concentração final de 5 mM por 48 horas. Após esse período de 48h, o meio NG sem FGF foi usado durante uma semana. Em seguida, o meio de crescimento de astrócitos AGM (do inglês *astrocyte growth medium* - Lonza, NJ, USA) foi adicionado às esferas durante duas semanas. Durante esse período, as células continuaram sob agitação constante a 90 rpm.

Após 3 semanas de diferenciação no agitador a 90 rpm, as neuroesferas foram plaqueadas em placas com revestimento de poliornitina e laminina, como descrito anteriormente para o método de diferenciação neuronal. Quando as esferas foram plaqueadas, os astrócitos foram liberados e começaram a crescer e se espalhar sobre a placa. Após a primeira passagem, as células que cercam as neuroesferas foram dissociadas enzimaticamente utilizando accutase (Corning® cellgro®, Virginia, USA).

Em geral, as células obtidas por esse protocolo podem ser mantidas por apenas 4-5 passagens até chegarem a um estágio de senescência. Os astrócitos utilizados neste trabalho foram caracterizados e utilizados entre as passagens 2 a 4.

4.3.5 Separação Magnética para enriquecimento neuronal

Como relatado acima, a população neuronal foi obtida após 4 semanas de diferenciação. Entretanto, essa população é mista e para que pudessemos realizar o experimento de co-cultivo celular era preciso utilizar uma população pura de neurônios. Para tanto, o isolamento desta população foi realizado utilizando o kit comercial de separação magnética MACS (Miltenyl Biotec, GL, Alemanha). Resumidamente, as células foram dissociadas, incubadas com o anticorpo anti-CD44 conjugado com ficoeritrina (anti-CD44-PE, BD Bioscience) e anti-CD184-PE (BD Bioscience) durante 15 minutos no escuro a 4°C. Após esse período de incubação, as células foram lavadas duas vezes com dPBS. Em seguida, as células foram incubadas com esferas magnéticas conjugadas com o anticorpo secundário PE durante 15 min a 4°C no escuro. Passado o período de incubação do anticorpo secundário, as células foram transferidas para uma coluna magnética e aquelas que eram CD44 e CD184 positivas ficaram retidas na coluna passando assim somente a população de neurônios enriquecidos, duplamente negativa para esses marcadores. A população neuronal obtida após essa separação foi utilizada no co-cultivo.

4.3.6 Co-cultivo de astrócitos e neurônios dos pacientes com transtorno autista e controles

Para o experimento de co-cultivo, neurônios e astrócitos foram diferenciados a partir das NPC em placas separadas como descrito acima.

Após a caracterização dos astrócitos por imunofluorescência usando marcadores específicos, as células foram plaqueadas em uma concentração de 5×10^6 por

lamínula em placas de 24 orifícios até atingirem a confluência de aproximadamente 80%.

O enriquecimento neuronal foi realizado através da remoção de células positivas para CD44 e CD184 na população neuronal mista utilizando separação magnética conforme descrito acima. Dessa forma, um total de 2×10^4 neurônios com 4 semanas de diferenciação foram semeados sobre os astrócitos e mantidos por mais duas semanas em meio de astrócitos. Passado este período de incubação, as células foram fixadas e um ensaio de imunofluorescência utilizando anticorpos anti-MAP2 (Sigma), anti-sinapsina 1 (Millipore) e anti-Homer 1 (Abcam) e uma combinação de anticorpos secundários com diferentes fluoróforos juntamente com a coloração DAPI nuclear foi realizado.

4.4 CARACTERIZAÇÃO CELULAR E MOLECULAR DAS CÉLULAS

4.4.1 Ensaios de imunofluorescência

As células foram cultivadas em placas de 24 orifícios sobre lamínula de vidro até atingirem a confluência desejada em torno de 80%. Em seguida, as células foram lavadas por 3 vezes de 5 minutos cada em dPBS e fixadas em 4% de paraformaldeído (USB Corporation) durante 15 minutos em temperatura ambiente.

Após fixação, as células foram lavadas 3 vezes com dPBS e permeabilizadas com 0,1% de Triton (Promega, WI, USA) por 15 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, as células foram submetidas ao bloqueio em dPBS contendo 2% de soro albumina bovino (do inglês *bovine serum albumin*, BSA - Life Technologies) durante 4 horas a temperatura ambiente. Após o bloqueio, as células foram incubadas com anticorpos primários conforme tabela 1 por 16 horas a 4 °C. Passado o período de incubação dos anticorpos primários, as células foram lavadas por três vezes com dPBS e submetidas a um novo bloqueio em dPBS contendo 2% BSA durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, os respectivos anticorpos secundários, Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 555 e Alexa Fluor 647 (Life Technologies)

foram adicionados de acordo com os primários (diluição 1:500) e incubados por 1 hora em temperatura ambiente. Ao final, as células foram lavadas 3 vezes com PBS 1x e DAPI (1µg/mL) foi adicionado por 5 minutos em temperatura ambiente. As lâminas foram montadas utilizando ProLong Gold (Life Technologies). A imunoreatividade foi avaliada em microscopia de fluorescência (Zeiss, Jena, Germany).

Quadro 1 - Anticorpos primários utilizados para caracterização celular

Anticorpos Primários	Fabricante	Diluição
anti-Vimentina	Cell Signaling	1:100
anti-CD105	Abcam	1:100
anti-CD73	Abcam	1:100
anti-Lin28	RD systems	1:100
anti-Sox2	Cell Signaling Technology	1:500
anti-Oct4	Abcam	1:100
anti-Nanog	ABR	1:100
anti-Nestina	Abcam	1:100
anti-NG2	Millipore	1:100
anti-Musashi1	Abcam	1:1000
anti-MAP2	Abcam	1:1000
anti-GFAP	Dako	1:1000
anti-S100B	Novus Bio	1:500
anti-Homer1	Synaptic Systems	1:200
anti-Synapsina1	Millipore	1:500

Fonte: Russo, F. B. (2015).

4.4.2 Extração de RNA e produção de cDNA

O RNA celular total foi extraído utilizando Trizol Reagente (Life Technologies). O cDNA foi realizado usando SuperScript III (Life Technologies) ambos protocolos foram realizados de acordo com a descrição dos fabricantes.

4.4.3 PCR Quantitativo (qPCR)

O cDNA obtido da extração de RNA foi submetido a PCR quantitativa (qPCR) utilizando *SYBR green Supermix* (Bio-Rad - CA, USA). Cada amostra foi testada em triplicata. Os oligonucleotídeos foram sintetizados para genes específicos usando software Primer3 (v. 0.4.0) ou então, utilizando as sequências disponíveis na *Harvard Primer Bank online* (Quadro 2). As condições dos ciclos de PCR foram as seguintes: 2 minutos, 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 60 °C e 45 segundos a 72 °C para 50 ciclos, seguidos pelo protocolo de curva de fusão para verificar a especificidade de geração de amplificação. Foi utilizado GAPDH como controle interno (*housekeeping gene*). Todas as análises foram feitas por quantificação absoluta, relativa ao gene de controle interno usando curvas padrão. Em seguida, os dados foram comparados e analisados no GraphPad Prisma 5 (GraphPad, CA, USA).

Quadro 2 – Oligonucleotídeos utilizados para caracterização celular por PCR em tempo real (qPCR)

Gene	Sense	Anti-sense
GAPDH	5'TGCACCACCAACTGCTTAGC3'	5'ATGGACTGTGGTCATGAG3'
Vimentina	5'GGAAGCCGAAAACACCCTG3'	5'GAGACGCATTGTCAACATCCT3'
CD105	5'TCTGGACCACTGGAGAATAC3'	5'GAGGCATGAAGTGAGACAAT3'
Nanog	5'TTTGTGGGCCTGAAGAAACT3'	5'AGGGCTGTCCTGAATAAGCAG3'
Sox2	5'CTCGTGCAGTTCTACTCGTCG3'	5'AGCTCTCGGTCAGGTCCTTT3'
Pax6	5'TGGGCAGGTATTACGAGACTG3'	5'ACTCCCGCTTATACTGGGCTA3'
Nestina	5'CAACAGCGACGGAGGTCTC3'	5'GCCTCTACGCTCTCTTCTTTGA3'
Map2	5'CGAAGCGCCAATGGATTCC3'	5'TGAAGTATCCTTGCAGACACCT3'
Homer1	5'AGAAGCTGCTCGACTAGCAAA3'	5'CCCGTTGATACTTTCCGGTGT3'
Sinapsina	5'AGTTCTTCGGAATGGGGTGAA3'	5'CAAAGTGCAGTAGTCTCCGTT3'
PSD95	5'TCGGTGACGACCCATCCAT3'	5'GCACGTCCACTTCATTTACAAAC3'
NCAM	5'ACATCACCTGCTACTTCCTGA3'	5'CTTGGACTCATCTTTGAGAAAGG3'
GFAP	5'CTGCGGCTCGATCAACTCA3'	5'TCCAGCGACTCAATCTTCCTC3'
NG2	5'GTGCTGACTGTCGTAGAGGG3'	5'AGGCGTTCAGAAACCCATCG3'
CD44	5'CTGCCGCTTTGCAGGTGTA3'	5'CATTGTGGGCAAGGTGCTATT3'

Fonte: Russo, F. B. (2015).

4.4.4 Fosfatase Alcalina

A detecção de fosfatase alcalina foi realizada nas células iPSC 3 semanas após o início da reprogramação utilizando um kit específico (Bio-Rad - CA, USA) . As iPSC foram fixadas em 4% de paraformaldeído durante 1-2 minutos. Após fixação, a solução de coloração foi adicionada e as células foram incubadas à temperatura ambiente protegida da luz durante 15 minutos. Após a incubação, as colônias positivas para fosfatase alcalina foram fotografadas (EOS5 - Canon, NY, USA).

4.4.5 Cariotipagem

A análise do cariótipo da banda G foi realizada em todos os clones das células NPC utilizadas neste trabalho. Essas análises foram realizadas pelo Serviço de Diagnóstico Molecular (Cytogenetics Laboratory, Children's Hospital, Los Angeles, CA).

4.4.6 Quantificação de sinapses colocalizadas (*Puncta* sináptica)

Para quantificação de sinapses um protocolo de imunofluorescência foi realizado usando os anticorpos anti-MAP2 para marcar os filamentos neuronais, anti-sinapsina 1 (proteína pré-sináptica) e anti-Homer 1 (proteína pós-sináptica). A contagem da puncta foi feita através da colocalização da proteína pré-sináptica com a proteína pós-sináptica utilizando o software específico IMARIS (Bitplane, Zurich, Switzerland). Em seguida, os dados foram comparados e analisados no GraphPad Prisma 5 (GraphPad, CA, USA).

4.4.7 Análise funcional das células por eletrofisiologia

Para a realização desse ensaio funcional, as NPCs foram cultivadas como descrito anteriormente em placas de 100mm de diâmetro. Quando as células atingiram uma confluência de aproximadamente 90%, o protocolo de produção de neuroesferas para eletrofisiologia foi iniciado. Para isso, as células foram incubadas com dPBS a 37 ° C durante 5 minutos e, em seguida, foram raspadas para formar neuroesferas utilizando 9 mL de meio NGF. As células foram dissociadas por pipetagem suave e distribuídos em 3 mL por poço numa placa de seis poços e mantidas em agitação constante (90 rpm). O meio foi trocado no dia seguinte e as células foram mantidas em meio NGF até a formação das neuroesferas. Após

formação das neuroesferas, o FGF foi removido e o Inibidor de Rock foi adicionado a uma concentração final de 5 mM por 48 horas. Passado esse período de incubação, o meio NG sem FGF foi usado para cultivo durante dez dias. Após esse período, as neuroesferas foram plaqueadas sobre placas com eletrodos específicos para eletrofisiologia e cultivadas com o meio NG e 1% de SFB durante uma semana e, posteriormente foram mantidas em meio neurobasal (Life Technologies) durante o período das leituras. A leitura desse experimento foi realizada a cada 4-5 dias no equipamento chamado MAESTRO (Axion Biosystems, GA, USA), onde podemos observar os picos de atividade (do inglês *spikes*) por segundos nos neurônios. Os dados foram comparados e analisados no GraphPad Prisma 5 (GraphPad, CA, USA).

Resultados

5 RESULTADOS

5.1 CULTIVO E CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO DE DENTE DECÍDUO ESFOLIADO DE PACIENTES COM TRANSTORNO AUTISTA E CONTROLES

Para a realização deste projeto, pacientes com transtorno autista (TEA) e controles (WT) doaram o dente decíduo após a queda espontânea. Foram processados 6 dentes, 3 de pacientes com transtorno autista e 3 dentes de voluntários sem TEA, chamados de controles e que foram utilizados em todos experimentos para comparação.

As SHED foram extraídas utilizando um protocolo adaptado de Miura et al., (2003) por digestão enzimática com Colagenase do tipo I. As SHED foram isoladas dos pacientes e controles eficientemente e aproximadamente 3 dias após a extração (isolamento) foi possível observar o desprendimento celular a partir da polpa dentária (Figura 2A). As células-tronco de polpa dentária dos pacientes com transtorno autista e controles cresceram bem aderidas ao plástico, apresentando morfologia fibroblástica, características de células-tronco mesenquimais (Figura 2B e 2C).

Para a análise da expressão gênica das SHED foi realizado um protocolo de qPCR confirmando que as células expressam marcadores de células-tronco mesenquimais como vimentina, CD105 e CD73, sem diferenças significativas entre pacientes e controles. Além disso, houve uma baixa expressão do marcador de pluripotência Oct3/4, (Figura 2D).

As análises da expressão de marcadores celulares para as SHED dos pacientes e controles foram realizadas através de ensaios de imunofluorescência utilizando anticorpos anti-vimentina, anti-CD73 e anti-CD105, confirmando a expressão desses marcadores tanto para as células dos pacientes como para os controles (Figura 2E e 2F). Novamente, não foram observadas diferenças fenotípicas significativas entre pacientes e controles.

Figura 2 - Cultivo e caracterização das células-tronco de dente decíduo esfoliado de pacientes com transtorno autista e controles

Fonte: Russo, F. B. (2014)

Legenda: A) Desprendimento das células-tronco de dente decíduo esfoliado (SHED) após 5 dias da coleta. B,C) Cultura de SHED com aproximadamente 80% de confluência dos controles (*wild type* - WT) e pacientes com transtorno autista (TEA), respectivamente. D) Análise da expressão gênica de vimentina, CD105, CD73 e Oct4 das células-tronco mesenquimais dos pacientes WT e TEA por qPCR. E-F) Análise da expressão dos marcadores Vimentina, CD105 e CD73 por imunofluorescência. Magnificação: A,B,C) 10x. E-F) 20x.

5.2 GERAÇÃO DE CÉLULAS PLURIPOTENTES INDUZIDAS A PARTIR DE CÉLULAS-TRONCO DE DENTE DECÍDUO ESFOLIADO DE PACIENTES COM TRANSTORNO AUTISTA E CONTROLES

As SHED de 3 pacientes com transtorno autista e 3 controles foram reprogramadas com sucesso utilizando o vírus Sendai. Neste estudo foram utilizados 2 clones de cada indivíduo, ou seja, foram estudados 6 clones derivados de pacientes com transtorno autista e 6 clones derivados de controles.

Na figura 3 estão apresentadas fotomicrografias representando a reprogramação celular apenas de 1 controle e 1 paciente, sendo que essas características foram observadas para todos os pacientes e controles reprogramados neste projeto. Nas imagens 3A e 3E estão representadas as SHED de pacientes com TEA e controles antes da infecção com o vírus Sendai com confluência de aproximadamente 80%, momento adequado para infecção viral e início do protocolo de reprogramação celular.

A reprogramação celular das SHED tanto dos pacientes quanto dos controles foi muito eficiente, sendo que com apenas 5 dias após o início do protocolo, ou seja, após transdução viral, foram observadas colônias em formação indicando que a reprogramação estava acontecendo (Figuras 3B e 3F). Além disso, com apenas 3 semanas após infecção foram visualizadas colônias arredondadas bem formadas com borda bem delimitada (Figuras 3C e 3G). Estas características das colônias aliada ao tamanho (colônias grandes como as que estão representadas) indicam que estão prontas para serem coletadas e cultivadas na condição *feeder free* sobre Matrigel ou seja, livre da camada de sustentação de fibroblastos murinos.

Quando colocadas sobre o Matrigel as colônias mantinham sua aparência de células pluripotentes, ou seja, células arredondadas com núcleo grande e citoplasma escasso, colônias planas e com a borda bem delimitada e definida (Figuras 3D e 3H). Estes resultados também foram observados para os demais pacientes e controles, que não representados nesta figura.

Figura 3 - Geração de células pluripotentes induzidas a partir de células-tronco de dente decíduo esfoliado de pacientes com transtorno autista e controles

Fonte: Russo, F. B. (2014)

Legenda: Reprogramação celular através da transdução com vírus Sendai recombinante carregando os “4 fatores de Yamanaka” (Oct3/4, Sox2, Klf4 and c-Myc) A,E) Células-tronco de dente decíduo esfoliado (SHED) de controle (WT) e de paciente com transtorno autista (TEA) antes da infecção com o vírus Sendai para a reprogramação celular. B,F) Aspecto de colônias iPSC de pacientes com TEA e WT 5 dias após a infecção. C,G) iPSC de pacientes com TEA e WT três semanas após a infecção apresentando colônias bem formadas, com a borda bem delimitada e prontas para coleta e cultivo livre da camada de sustentação. D,H) Imagem representativa das colônias de iPSC estabelecidas e cultivadas sobre Matrigel em condição livre da camada de sustentação. Durante todo o tempo de experimento foram observadas as mesmas características para as iPSC de pacientes com TEA e dos WT. Magnificação: A-H) 4x. Barra de escala: A-H) 1000µm.

5.3 CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS PLURIPOTENTES INDUZIDAS A PARTIR DE CÉLULAS-TRONCO DE DENTE DECÍDUO ESFOLIADO DE PACIENTES COM TRANSTORNO AUTISTA E CONTROLES

Para caracterização das iPSC geradas a partir das SHED dos pacientes e dos controles, foram realizados alguns experimentos. A figura 4 ilustra os resultados obtidos para as iPSC de um controle e um paciente, mas resultados semelhantes foram observados em todos os clones dos pacientes e controles estudados.

A expressão gênica foi verificada através de um ensaio de qPCR, sendo evidenciado que as células iPS expressavam marcadores de pluripotência como Oct3/4, Nanog e Sox2, enquanto as SHED não expressavam quantidades significativas destes marcadores antes da reprogramação. Para o marcador de células-tronco mesenquimais CD105 houve diminuição da expressão após a reprogramação celular (Figura 4A). Em tempo, praticamente não foi observada diferença na expressão genética entre pacientes (TEA) e controles (WT).

A atividade da fosfatase alcalina foi testada para checar o fenótipo de pluripotência das colônias, sendo que colônias obtidas 3 semanas após o início da reprogramação apresentaram-se positivas, sugerindo que as células estavam reprogramadas uma vez que a atividade desta enzima só ocorre em células pluripotentes (Figura 4B).

Por fim, as colônias de iPSC foram analisadas quanto a expressão de marcadores específicos de pluripotência por ensaio de imunofluorescência onde houve expressão significativa dos marcadores como Lin28, Sox2, Oct3/4 e Nanog nas iPSC obtidas dos controles e pacientes (Figuras 4C e 4D).

Estes resultados em conjunto apoiam que houve a reprogramação das células-tronco de dente decíduo esfoliado para iPSC.

Figura 4 - Caracterização das iPSC obtidas a partir das células-tronco de dente decíduo esfoliado de pacientes com transtorno autista e controles

Fonte: Russo, F. B. (2014)

Legenda: A) Análise da expressão gênica dos marcadores de pluripotência Oct3/4, Nanog e Sox2 e de células-tronco mesenquimais, CD105 das iPSC por qPCR, mostrando que as iPSC apresentaram alta expressão dos genes de pluripotência quando comparados às SHED e o inverso, baixa expressão do CD105 quando comparado às SHED. B) Colônias iPSC positivas para fosfatase alcalina de um controle representando colônias iPSC dos outros controles e pacientes. C-D) Ensaio de imunofluorescência confirmando a presença de marcadores de pluripotência Lin28, Sox2, Oct3/4 e Nanog nas iPSC de pacientes com transtorno autista e controles. Magnificação: C-D)10x.

5.4 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS PROGENITORAS NEURAIS DE PACIENTES COM TRANSTORNO AUTISTA E CONTROLES

Para produção das células progenitoras neurais (NPC) foi realizado o protocolo conforme descrito anteriormente (item 4.3.2).

A sequência de eventos que atencede a produção de NPC está elucidado na figura 5. A partir das iPSC (Figura 5A) foram produzidos os corpos embróides (EB) (Figura 5B), que gerou as rosetas neurais (Figura 5C) de onde foram coletadas as NPC (Figuras 5D, E e F). As NPC foram mantidas na mesma placa até atingirem aproximadamente 80% de confluência (Figuras 5E e 5F).

O cariótipo das NPC foi checado tendo em vista que não seria possível seguir com os experimentos com células com cariótipo alterado. Nenhuma anormalidade cariotípica foi observada nos clones utilizados neste estudo, ou seja, todas as células mantiveram o cariótipo normal após o processo de reprogramação celular. A figura 5G é uma imagem ilustrativa do cariótipo de NPCs de um controle e de um paciente.

A expressão de alguns genes característicos de NPC foi verificada através da técnica de qPCR, sendo observada a expressão dos genes Sox2, Nestina e Pax6. A expressão do marcador neuronal MAP2 (proteína associada a microtúbulos 2) foi mais baixa comparada em NPC de WT do que em pacientes TEA. aos neurônios. Por fim, para NG2, marcador de específico de oligodendrócitos contaminantes, houve baixa expressão (Figura 6A). Estes resultados juntos sugerem que as células obtidas de fato poderiam ser consideradas progenitoras neurais e não estavam presentes na cultura de NPC células contaminantes.

Além disso, em paralelo, foi analisada por imunofluorescência a de marcadores para NPC, inclusive alguns marcadores que foram identificados por qPCR. Tanto os controles quanto os pacientes apresentaram a expressão para Sox2, Musashi 1 e Nestina. Por outro lado, estas células foram negativas para MAP2 e NG2 (Figuras 6B e 6C).

Figura 5 - Produção de células progenitoras neurais a partir das iPSC obtidas dos pacientes com transtorno autista e controles

Fonte: Russo, F. B. (2014)

Legenda: A-D) Etapas do protocolo para a produção de células progenitoras neurais, onde observamos células iPSC, EBs, rosetas neurais e NPCs. E-F) Cultura de células NPC de controles e pacientes com TEA com aproximadamente 80% de confluência. G) Carió tipo por banda G dos controles e pacientes onde não foram observadas anormalidades cariotípicas após reprogramação celular dos clones isolados. Magnificação: A-F) 4x. Barra de escala: A-F) 1000µm.

Figura 6 - Caracterização das células progenitoras neurais obtidas a partir das iPSC dos pacientes com transtorno autista e controles

Fonte: Russo, F. B. (2014)

Legenda: A) Análise da expressão gênica das NPCs por qPCR para os marcadores de células progenitoras neurais (Nestina, Pax6 e Sox2), para o marcador neuronal (MAP2) e de oligodendrocitos, células contaminantes, NG2. B-C) Ensaio de imunofluorescência mostrando a expressão positiva de marcadores de precursores neurais como o Sox2, Musashi 1 e Nestina e negativa para MAP2 e NG2. Magnificação: B-C) 20x.

5.5 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS NEURÔNIOS DERIVADOS DAS IPSC DE PACIENTES COM TRANSTORNO AUTISTA E CONTROLES

A população de células progenitoras neurais (NPC) gerou neurônios maduros conforme protocolo descrito no item 4.3.3 e está representada na figura 7A-D. O primeiro passo para a diferenciação neuronal inicia-se com cultura de NPC com aproximadamente 70% de confluência, concentração de células utilizadas para o início do protocolo (Figura 7A). Na primeira fase do processo, que dura apenas 48h na presença de inibidor de Rock (Ri) e ausência de FGF, não foi possível observar variações significativas de morfologia celular (Figura 7B). Nas semanas seguintes, a morfologia das NPC foi se alterando significativamente (Figura 7C) até obtermos na quarta semana de diferenciação o aspecto morfológico de neurônios, ou seja, células com pequeno corpo celular, muitas projeções e ramificações, sendo algumas bastante longas (Figura 7D). Para afirmar que a diferenciação ocorreu de forma satisfatória e as células com as características morfológicas mencionadas acima eram realmente neurônios, foi preciso caracterizá-las quanto a expressão de marcadores e funcionalidade.

O aspecto dos neurônios obtidos após quatro semanas de diferenciação de controle e pacientes com TEA estão representados pelas Figuras 7E e 7F onde foi possível observar a morfologia de neurônios, descrita anteriormente.

Para caracterização molecular, a expressão de marcadores neuronais foi avaliada por qPCR. A expressão antes e após a diferenciação neuronal foi verificada utilizando as NPC como controle para comparação. Na figura 8A estão os resultados obtidos no qPCR, onde nos neurônios WT e TEA houve amplificação dos marcadores neuronais MAP2, Sinapsina 1 (proteína característica e utilizada como marcador pré-sináptico) e NCAM (marcador de adesão celular específico para neurônios), sendo o contrário para as NPC, que são as células progenitoras e apresentam baixa expressão destes marcadores. Interessante salientar a menor expressão de sinapsina nos neurônios TEA em relação aos neurônios controles. Por outro lado, foi observado a expressão de Nestina e Sox2 nas NPC maior do que nos neurônios, o que era esperado já que estes são marcadores de NPC. Em tempo, apesar de não significativo, interessante notar que tanto para Nestina quanto para

Sox2 aparentemente as NPC TEA expressaram mais esses genes do que as NPC WT (figura 8A).

A expressão de marcadores característicos para neurônios também foi verificada por imunofluorescência nas células submetidas ao processo de diferenciação neuronal dos pacientes com TEA e controles. A expressão do MAP2, marcador de neurônios maduros foi observada em todos os clones, tanto nos pacientes quanto nos controles. A expressão de GFAP, marcador de células da glia foi detectada na cultura diferenciada, sendo esse resultado previsto uma vez que na cultura há uma população mista de astrócitos e neurônios. Além disso, na cultura de neurônios diferenciados não houve marcação para células NG2, consideradas contaminantes de cultura (Figura 8B).

Com base nesses resultados, é possível considerar que o protocolo de diferenciação produziu neurônios com morfologia e marcadores neuronais, possivelmente maduros, mas restava ainda verificar se os neurônios tinham atividade neuronal.

Para tanto, foi feito o ensaio funcional de eletrofisiologia nos neurônios revelando que as células possuíam atividade mas, baseado no número menor de picos de atividade por segundo (do inglês *spikes*), os neurônios de pacientes com transtorno autista (TEA) apresentavam menos atividade quando comparados com os controles (WT) (Figura 8C).

Figura 7 - Etapas da diferenciação neuronal à partir das iPSC dos pacientes com transtorno autista e controles

Fonte: Russo, F. B. (2014)

Legenda: A-D) Fotomicrografia das alterações morfológicas durante o processo de diferenciação neuronal. A) Células progenitoras neurais (NPC) cultivadas em meio NGF. B) Primeira semana de diferenciação neuronal, onde as células são cultivadas com inibidor de Rock (Ri) durante 48 horas e sem fator de crescimento de fibroblastos (FGF). C) Fotomicrografia do cultivo dos neurônios com meio NG na ausência de inibidor de Ri e FGF durante 4 semanas. D) Fotomicrografia dos neurônios maduros após 4 semanas de diferenciação. E-F) Imagens microscópicas representativas dos neurônios de controles e pacientes com TEA após 4 semanas de diferenciação neuronal. Magnificação: A) 10x. B,C,E,F) 20x. D) 40x. Barra de escala: A) 400µm. B,C,E,F) 200µm. D) 100µm.

Figura 8 - Caracterização dos neurônios obtidos a partir das iPSC dos pacientes com transtorno autista e controles

Fonte: Russo, F. B. (2014)

Legenda: A) Análise da expressão gênica antes e após a diferenciação neuronal. Neurônios obtidos mostraram expressão para MAP2, sinapsina 1 e NCAM, ao contrário das NPCs que apresentaram uma baixa expressão destes marcadores. Por outro lado, observamos uma maior expressão de Nestina e Sox2 nas NPC e baixa expressão desses marcadores nos neurônios. B) Imunofluorescência revelando células expressando MAP2 e GFAP. Não houve marcação para NG2 nos neurônios diferenciados dos pacientes com TEA e controles. C) Picos de atividade neuronal em neurônios de pacientes com transtorno autista e controles. Observa-se um número menor de spike/segundo nos neurônios derivados dos pacientes quando comparados com os controles. Magnificação: B) 20x.

5.6 ANÁLISE DOS EVENTOS SINÁPTICOS EM NEURÔNIOS OBTIDOS À PARTIR DAS IPSC DE PACIENTES COM TRANSTORNO AUTISTA E CONTROLES

Com vistas a analisar a comunicação entre os neurônios diferenciados em cultura, foi feita a análise da expressão de genes sinápticos por qPCR, para genes pré-sinápticos (Sinapsina 1) e pós-sináptico (PSD95). Os neurônios dos pacientes com TEA apresentaram uma significativa diminuição na expressão de ambos os genes (Figura 9A) quando comparados com o controle.

Com base nesse resultado, foram feitas análises dos eventos sinápticos por imunofluorescência usando marcadores específicos para as proteínas pré-sináptica (Sinapsina 1, em vermelho) e pós-sináptica (Homer 1, em verde) (Figura 9B). Além disso, os filamentos neuronais foram marcados com MAP2 para mapear os prolongamentos neuronais (em branco na figura 9B). A análise da *puncta* sináptica, que é a colocalização entre marcadores pré e pós-sinápticos, foi realizada utilizando o software IMARIS para contar o número de pontos marcados por Sinapsina1, Homer1 e colocalização entre eles (*puncta*) (Figura 9B). Para isso, somente marcação próxima aos filamentos (MAP2) foram consideradas (Figura 9B – círculos). Nesse ensaio foi observado que os neurônios dos pacientes com transtorno autista reduziram de forma significativas os “pontos” de ambas as proteínas (Sinapsina1- $p < 0,01$ e Homer1- $p < 0,01$) quando comparados aos controles (WT). Ao analisar a co-localização destes marcadores (números de *punctas*), esta diminuição foi ainda mais acentuada ($p = 0,001$) (Figura 9C). Considerando esses dados é possível inferir que neurônios de pacientes com transtorno autista (TEA) apresentam redução no número de sinapses em relação aos neurônios dos controles (WT).

Figura 9 – Análise dos eventos sinápticos nos neurônios obtidos *in vitro* dos pacientes com transtorno autista e controles

Fonte: Russo, F. B. (2014)

Legenda: A) Análise da expressão gênica dos genes Sinapsina 1 (pré-sináptico) e PSD95 (pós-sináptico) em neurônios com 4 semanas de diferenciação por qPCR. Há uma redução significativa nos níveis de expressão dessas proteínas nos neurônios de pacientes com transtorno autista (TEA) quando comparado aos controles (WT). B) Análise da expressão dos marcadores por imunofluorescência nos neurônios dos pacientes e controles para análise de sinapses, onde observamos marcação para Sinapsina1 (vermelho), Homer1 (verde) e MAP2 (branco). Os círculos representam a co-localização dos botões pré e pós-sináptico (*puncta*). C) Análise da contagem dos botões sinápticos (pontos) para os marcadores pré-sinápticos, pós-sinápticos e sua co-localização (*punctas*). É possível observar uma redução significativa no número de eventos sinápticos nos neurônios de pacientes com transtorno autista (TEA) com redução nos marcadores pré-sinápticos, pós-sinápticos e na colocalização entre eles, ou seja redução no número de *puncta* sináptica. Magnificação: B) 63x.

5.7 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ASTRÓCITOS OBTIDOS À PARTIR DAS IPSC DE PACIENTES COM TRANSTORNO AUTISTA E CONTROLES

Os astrócitos foram obtidos com a intenção de caracterizar a relação entre astrócitos e neurônios, já que os astrócitos são essenciais à sobrevivência e manutenção dos neurônios. Inicialmente foi feita a caracterização isolada dos astrócitos e na figura 10 é possível observar a morfologia das células NPC até sua diferenciação em astrócitos (Figura 10 A-C). Nas figuras 10D e 10E podemos observar a morfologia de células estreladas e grandes da cultura de astrócitos dos controles (WT) e dos pacientes com transtorno autista (TEA), 7 semanas após o início do protocolo de diferenciação.

Para caracterização da expressão gênica dos astrócitos foram realizados ensaios de qPCR visando comparar a expressão de marcadores específicos antes e após a diferenciação astrocitária, utilizando como controle as NPC. Os resultados revelaram que os astrócitos expressavam marcadores específicos como o GFAP, o CD44 e vimentina, ao contrário das NPC que não apresentavam expressão para GFAP e CD44. Para a vimentina, foi observada a menor expressão nas NPC quando comparado aos astrócitos. Por outro lado, foi observada uma baixa expressão de nestina nos astrócitos quando comprado a NPC. A expressão de Sox2 foi observada tanto nas NPC como nos astrócitos (Figura 11A).

A partir dos ensaios de imunofluorescência foi possível observar a marcação para GFAP (marcador de células da glia), S100B (marcador de astrócitos maduros), e vimentina (progenitor de astrócitos). Não houve marcação para NG2 (marcador de oligodendrócito) considerado marcador de células contaminantes (Figuras 11B e 11C).

Figura 10 - Análise dos astrócitos obtidos á partir das células iPSC dos pacientes com transtorno autista e controles

Fonte: Russo, F. B. (2014)

Legenda: A) Fotomicrografia das células progenitoras neurais com confluência adequada para o início da diferenciação e produção de astrócitos. B) NPCs cultivadas em suspensão para produção de neuroesferas. C) Neuroesferas plaqueadas em placas revestidas com poliornitina e laminina, onde podemos observar as neuroesferas liberando os astrócitos. D) Cultura dos astrócitos dos controles com 7 semanas de diferenciação. E) Cultura dos astrócitos dos pacientes com transtorno autista (TEA) com 7 semanas de diferenciação. Magnificação: A-B) 4x. C-E) 10x. Barra de escala: A-B) 1000µm C-E) 400µm.

Figura 11 - Caracterização dos astrócitos obtidos a partir das iPSC dos pacientes com transtorno autista e controles

Fonte: Russo, F. B. (2014)

Legenda: A) Análise da expressão gênica antes e após a diferenciação astrocitárias visando comparar os astrócitos diferenciados com as células progenitoras neurais (NPC). Os astrócitos obtidos expressavam marcadores como GFAP, CD44 e Vimentina, ao contrário das NPCs que não expressavam GFAP e CD44 e apresentam uma menor expressão de vimentina. Por outro lado, houve maior expressão de Nestina nas NPC quando comparada aos astrócitos. Já a expressão de Sox2 foi observada tanto nas NPC quanto na cultura de astrócitos. B-C) Análise da expressão de GFAP, S100B e Vimentina e NG2 nos astrócitos dos controles (WT) e dos pacientes com transtorno autista (TEA). Os resultados mostram que houve expressão de todos os marcadores específicos de astrócitos (GFAP, CD44 e vimentina) e não houve a expressão de NG2. Magnificação: B-C) 20x.

5.8 CO-CULTIVO ENTRE NEURÔNIOS E ASTRÓCITOS PRODUZIDOS À PARTIR DAS CÉLULAS IPS DOS PACIENTES COM TRANSTORNO AUTISTA E CONTROLES

Após a diferenciação das NPC em astrócitos foram feitos ensaios para analisar a interação e influência dos astrócitos nos neurônios dos pacientes com transtorno autista através do co-cultivo entre neurônios e astrócitos maduros. Como a cultura de neurônio é mista, os neurônios de pacientes com e sem autismo foram isolados através da remoção de células positivas para CD44 e CD184 por separação magnética, como descrito no item material e método. Então, os neurônios foram plaqueados sobre os astrócitos de pacientes com e sem transtorno autista para analisar a interação entre essas células e também a influência dos astrócitos nos neurônios uma vez que esta é a condição fisiológica padrão. Para elucidar melhor este experimento um esquema representativo de ensaio pode ser observado na figura 12A.

Como relatado anteriormente, para esse experimento foram realizadas 4 diferentes condições de cultivo. 1) Neurônios de controles (WT) cultivados sobre astrócitos de controles (WT); 2) Neurônios de controles (WT) cultivados sobre astrócitos de pacientes com TEA; 3) Neurônios de pacientes com TEA cultivados sobre astrócitos de controles (WT); 4) Neurônios de pacientes com TEA cultivados sobre astrócitos de pacientes com TEA. Após o co-cultivo nas condições descritas acima, um ensaio de imunofluorescência foi realizado conforme descrito no item 4.4.1 do material e método para marcação dos neurônios e análise morfológica dessas células nas condições de co-cultivo (Figuras 12B-12E).

No co-cultivo das células, neurônios de controles plaqueados sobre astrócitos de controles (WT) resultaram em neurônios mais complexos, com arborização e com característica normais (Figura 12B). Neurônios de WT plaqueados sobre astrócitos de pacientes com TEA, resultaram em alteração da morfologia neuronal, onde os neurônios pareceram imaturos e menos complexos (Figura 12C). Para neurônios de pacientes com TEA plaqueados sobre astrócitos WT, houve um aparente resgate do fenótipo neuronal, ou seja, os neurônios afetados que antes pareciam imaturos na figura 12C mostram-se mais maduros e complexos, mais próximo da normalidade,

sugerindo que os astrócitos WT poderiam “curar” os neurônios afetados pela doença (Figura 12D). Por fim, neurônios dos pacientes com TEA cultivados sobre astrócitos de pacientes com TEA apresentavam a mesma característica encontrada na condição de cultivo de neurônios WT com astrócitos de pacientes com TEA com neurônios sem arborização e imaturos, indicando que astrócitos “doentes” poderiam estar afetando o neurônio normal (Figura 12E).

Para verificar se os astrócitos afetariam a comunicação entre os neurônios, foram realizados ensaios para analisar eventos sinápticos em co-cultura, onde foram observados os níveis de proteínas pré-sináptica, pós-sinápticas e colocalização (*puncta* sináptica) entre elas. Esse ensaio foi realizado com as mesmas células e condições de co-cultivo descritas anteriormente, ou seja, essas análises foram feitas novamente nas 4 diferentes condições de cultivo.

Quando neurônios de pacientes WT foram cultivados sobre astrócitos de pacientes com TEA houve uma diminuição significativa no nível de marcadores sinápticos, inferindo que astrócitos de pacientes com TEA afetavam neurônios normais em relação às sinapses (Figura 13A).

Já no co-cultivo entre neurônios de pacientes com TEA e astrócitos de pacientes WT, houve um aumento significativo no nível de marcadores sinápticos, reforçando a hipótese de que astrócitos saudáveis “recuperam” neurônios de pacientes com TEA em relação ao número de sinapses (Figura 13B).

A figura 13C traz o resumo dos dados da colocalização (*punctas*) entre os botões pré e pós-sinápticos, onde se observa uma significativa diminuição no número de *punctas* nos neurônios WT cultivados sobre astrócitos de pacientes com TEA. Já quando neurônios de pacientes com TEA foram cultivados sobre astrócitos WT houve um aumento significativo na colocalização dos botões sinápticos.

Finalmente, estes dados indicam que os astrócitos influenciam na maturação, na complexidade e funcionalidade dos neurônios de pacientes com transtorno autista, dados nunca mostrados anteriormente para o autismo infantil.

Figura 12 - Co-cultivo entre neurônios e astrócitos produzidos à partir das iPSC dos pacientes com transtorno autista e controles

Fonte: Russo, F. B. (2014)

Legenda: A) Esquema representativo do ensaio de co-cultura entre neurônios e astrócitos de controles (WT) e pacientes com transtorno autista (TEA). B) Co-cultura entre neurônios e astrócitos de indivíduos WT. Observa-se neurônios mais complexos, bastante arborizados e com característica normais. C) Neurônios WT cultivados sobre astrócitos de paciente com TEA. Observa-se que a morfologia desse neurônio mudou e a célula se mostra imatura e menos complexa, indicando que astrócitos “doentes” podem afetar neurônios normais. D) Neurônios de paciente com TEA cultivado sobre astrócitos de pacientes WT. Neurônios TEA mostram-se mais maduros e complexos, mais próximo da normalidade, o que sugere que os astrócitos “normais” podem “resgatar” os neurônios afetados pela doença. E) Observa-se co-cultura entre neurônios e astrócitos de pacientes com TEA. Neurônios sem arborização, menos complexo e menos maduro. Magnificação: B-E) 20x.

Figura 13 - Análise do perfil sináptico nas condições de co-cultivo entre neurônios e astrócitos produzidos à partir das células iPS dos pacientes com transtorno autista e controles

Fonte: Russo, F. B. (2014)

Legenda: A) Análises de botões sinápticos em co-cultura onde podemos observar que astrócitos de pacientes com transtorno autista (TEA) afetam neurônios de paciente controles (WT) em relação as sinapses. B) Análises de botões sinápticos em co-cultura onde podemos observar que astrócitos de pacientes WT recuperam neurônios de pacientes com TEA em relação as sinapses. C) Gráfico representativo dos resultados de colocalização em maior escala.

Discussão

6 DISCUSSÃO

O autismo tem sido alvo de estudos na comunidade científica mundial. Graças a esses esforços, novas e importantes informações têm surgido e aumentando o conhecimento de uma patologia que ainda permanece com suas causas e mecanismos incertos.

Neste trabalho aproveitamos a tecnologia das células reprogramadas para modelar e estudar alguns fenótipos *in vitro* envolvidos no autismo idiopático através da produção de células nervosas diferenciadas a partir das iPSC.

Para reprogramação e obtenção das células iPS escolhemos o método de transdução viral, onde utilizamos o vírus Sendai (CytoTune Kit), que carrega os 4 fatores de Yamanaka (Oct3/4, Sox2, c-Myc e Klf4). O vírus Sendai foi escolhido pois é um vírus não integrativo já que um dos principais obstáculos na geração de iPSC é o potencial de modificações do genoma celular como resultado do uso de vetores integrativos durante a reprogramação (LIEU et al., 2013). A utilização de um vetor não integrativo é fundamental, principalmente quando o objetivo é estudar doenças sem causas bem elucidadas como é o caso do autismo infantil.

A modelagem do autismo infantil nunca tinha sido demonstrado até o ano passado, quando os nossos colaboradores publicaram o primeiro trabalho mostrando que é possível resgatar fenótipos *in vitro* desse tipo de autismo. Nesse estudo os fenótipos celulares e moleculares foram investigados (GRIESI-OLIVEIRA et al., 2014). Assim como nossos colaboradores também obtivemos sucesso na modelagem do autismo idiopático e podemos inferir que a tecnologia de iPSC abre portas para uma melhor compreensão desse transtorno.

Para reprogramação e obtenção das iPSC, utilizamos como fonte, as células-tronco de dente decíduo esfoliado (SHED), que é uma excelente fonte celular para estudar doenças pediátricas como o autismo, já que o dente cai naturalmente, a coleta não é invasiva e não causa nenhum desconforto ao paciente.

Do ponto de vista biológico, as células de polpa dentária pode vir a ser uma melhor fonte de iPSCs para a modelagem de transtornos neuropsiquiátricos já que a sua origem embrionária é ectomesenquimal, mais especificamente da crista neural

(CHEN et al., 2013). Esse mesmo grupo de pesquisadores realizou um extenso perfil de expressão gênica em neurônios derivados de iPSCs produzidas a partir das células do dente através de análises de RNA-Seq, comparando com neurônios derivados de iPSCs produzidas a partir de fibroblastos da pele. Nesse estudo um elevado grau de correlação entre essas duas fontes foi relatado. No entanto, há diferenças sutis que podem influenciar na decisão em usar uma ou outra fonte celular para o estudo de alguns transtornos neuropsiquiátricos. Esse trabalho sugere que os neurônios produzidos a partir das iPSC derivadas das células do dente podem ter algumas vantagens sobre aqueles neurônios derivados de fibroblastos para estudar o autismo. Sendo assim, a questão da origem da célula a ser reprogramada deve ser considerada uma vez que, aparentemente, mesmo após a reprogramação, a célula mantém uma memória de sua origem (MARCHETTO et al., 2008).

Neste projeto, a reprogramação celular das SHED foi bem sucedida para todos os 3 pacientes e 3 controles. O tempo da reprogramação foi relativamente rápido, pois com apenas 3 semanas fomos capazes de isolar e amplificar os clones. Para todos os ensaios realizados nesse projeto foram utilizados 2 clones de cada paciente e 2 clones de cada controle, totalizando 12 clones. Acreditamos que o tempo curto de reprogramação das SHED se dá pelo fato de que essas células são células-tronco mesenquimais e por isso expressam alguns genes e marcadores de células indiferenciadas (GRONTHOS et al., 2000) as deixando em um estágio de diferenciação intermediário, ou seja, mais próximo ao das iPSC quando comparado com outras células como os fibroblastos, que são células mais diferenciadas (BELTRÃO-BRAGA et al., 2011). Esse é outro ponto positivo em utilizar as SHED como fonte celular já que a geração das iPSC é um protocolo muito custoso e exige mão de obra especializada e diária.

Como o objetivo desse trabalho foi estudar os fenótipos envolvidos no autismo, logo após estabelecer e amplificar as iPSC os protocolos para produção de neurônios e astrócitos foram iniciados. Esses protocolos foram realizados no laboratório do Professor Aysson Muotri, co-orientador desse projeto. Devido a experiência do nosso grupo obtivemos sucesso com a produção das células nervosas.

Para produção dos neurônios seguimos os protocolos descritos por Marchetto et al., (2010), onde a partir das células iPS são produzidos os corpos embrióides (EB), que são plaqueados para a obtenção das rosetas neurais, local de onde as células progenitoras neurais (NPC) se originam, são isoladas e cultivadas.

As NPC geradas neste projeto se comportaram sem diferenças significativas entre pacientes com autismo e controle, no que tange a expressão de alguns genes característicos dessas células, como Nestina, Pax 6 e Sox2. Entretanto, para a expressão de MAP2, marcador neuronal, é interessante citar que foi observada uma expressão significativamente maior de na população de NPC dos pacientes com TEA quando comparada ao controle. Isto pode sinalizar algum tipo de mecanismo ocorrendo no autismo, talvez de compensação, já que os neurônios derivados dos pacientes são aparentemente menos complexo e menos funcionais em relação aos neurônios controle, como visto em nosso trabalho e extrapolando resultados encontrados em outras pesquisas cujas doenças tenham alguma correlação com o autismo (MARCHETTO et al., 2010).

Além da caracterização, as NPC foram submetidas a cariotipagem, para analisar se a reprogramação celular e diferenciação resultou em alguma alteração do cariótipo. Os clones que apresentam qualquer alteração são descartados e somente clone com cariótipo normal foram utilizados nesse trabalho. Esse passo é fundamental quando trabalhamos com iPSC principalmente para estudar doenças genéticas. O cariótipo deve ser sempre checado, para que alterações fenotípicas não sejam falsamente culpabilizadas pela doença quando na verdade o fenótipo observado poderia ser causado pelo cariótipo anormal causado durante a reprogramação celular.

A partir do momento da obtenção das NPC e caracterização podemos iniciar o protocolo para produção neuronal que leva cerca de 4-5 semanas para obtenção de neurônios maduros. O protocolo é relativamente demorado mas já está bem estabelecido por nosso grupo e colaboradores (MARCHETTO et al., 2010). Todos os clones estudados nesse trabalho foram diferenciados com sucesso, onde na primeira semana de diferenciação já podemos observar alterações morfológicas indicando diferenciação. Após aproximadamente 30 dias de diferenciação os neurônios produzidos mostraram expressão para marcadores específicos como

MAP2, NCAM, Sinapsina 1, PSD95 e Homer 1 indicando maturidade e sucesso na diferenciação (MARCHETTO et al., 2010; GRIESI-OLIVEIRA et al., 2014)).

Apesar dos neurônios apresentarem expressão desses marcadores, isso ainda não era o suficiente para analisar se estavam funcionando na cultura celular ou não. Para analisar funcionalmente essas células, foram realizados ensaios para avaliar os picos de atividade neuronal (*spikes*) por segundo e pudemos observar que ambos neurônios derivados tanto dos pacientes com TEA quanto dos controles apresentaram correntes espontâneas, o que indica que em nossos protocolos obtivemos neurônios eletrofisiologicamente ativos, indicando maturação neuronal e funcionalidade. No entanto pudemos observar um número menor de *spikes* por segundo nos neurônios derivados dos pacientes quando comparados com os controles, indicando menos atividade nos neurônios autistas.

A formação anormal das redes neuronais e o desequilíbrio patológico da neurotransmissão estão associados com os transtornos autistas. A sinaptogênese é o processo de geração de sinapses funcionais entre os neurônios no sistema nervoso e é um passo crítico na geração de rede neural (PRILUTSKY et al., 2014). A plasticidade sináptica é fundamental para o adequado funcionamento cognitivo e sabemos que alterações sinápticas tem sido relatadas em pacientes com autismo (MARCHETTO et al., 2010; SPOOREN et al., 2012; DE RUBEIS et al., 2014).

Em nosso trabalho realizamos alguns experimentos por qPCR para analisar a expressão de genes pré e pós-sinápticos (Sinapsina 1 e PSD95 respectivamente). Nesses ensaios os resultados demonstraram significativa diminuição na expressão desses genes, indicando que pacientes com TEA podem produzir menos sinapses do que os controles. Esse ensaio foi apenas de expressão gênica, então buscamos verificar a presença de proteínas e realizamos um ensaio buscando estudar os eventos sinápticos (*punctas*) nos neurônios de todos os pacientes e controles usados neste trabalho. Para esse ensaio o número de proteínas pré e pós- sinápticas e a colocalização entre elas foi quantificado nos neurônios com a utilização de um software específico para essas análises.

Nossos resultados demonstraram uma diminuição significativa nos números de pontos pré sinápticos, pós sinápticos e na colocalização (*punctas*) entre eles em todos

os neurônios (clones) derivados dos pacientes com TEA, confirmando assim que o cérebro autista aparentemente faz menos sinapses do que um cérebro sem autismo. Esses mesmos resultados de redução no número de sinapses já foram relatados em neurônios derivados de pacientes com Síndrome de Rett, uma forma sindrômica do autismo (MARCHETTO et al., 2010).

Além de todas essas alterações, que podem ser consideradas funcionais por comprometer a função neuronal, também observamos em nossos resultados que os neurônios de pacientes autistas apresentam alterações morfológicas, sendo mais imaturos e menos complexos, ou seja, com menos arborização e prolongamentos do que neurônios de indivíduos sem autismo, observação que também foi feita com outras patologias relacionadas ao autismo (MARCHETTO et al., 2010).

Neste trabalho foi possível estudar alguns fenótipos nos neurônios dos pacientes com autismo idiopático infantil trazendo um melhor entendimento sobre algumas características do cérebro autista. Todas essas evidências e alterações nos fenótipos neuronais nos faz pensar que o autismo é uma doença neuronal e que se revertermos essas alterações talvez alcançaremos a cura. Entretanto, cada vez mais pesquisas revelam o papel fundamental das células da glia no sistema nervoso central e das possíveis influências dos astrócitos sobre os neurônios (JOHNSON et al., 2007; ZHANG; BARRES, 2010; COLANGELO et al., 2014; PEKNY et al., 2014), o que faz sentido inclusive considerando que os astrócitos são as células mais abundantes no SNC.

Os astrócitos são muitas vezes fornecidos durante a maturação dos neurônios uma vez que promovem sinaptogêneses (JOHNSON et al., 2007). Existem algumas evidências de que os astrócitos contribuem para a fisiopatologia dos transtornos do desenvolvimento neurológico como o autismo (WILLIAMS et al., 2014). Entretanto, apesar de existirem vários protocolos para produzir neurônios maduros *in vitro*, a exemplo de Marchetto et al., 2010, cujo protocolo foi replicado com sucesso neste trabalho, o mesmo não é verdadeiro para os astrócitos. Por ocasião de nossa colaboração ativa com o grupo do Prof Alysson Muotri, tivemos acesso a um protocolo ainda não publicado de produção de astrócitos *in vitro* a partir das células iPS desenvolvido em seu laboratório. De posse do protocolo, lançamos mão dessa plataforma para enfim estudar a interação entre neurônios e astrócitos, situação mais

proxima da fisiologica que pode permitir um melhor entendimento dos mecanismos envolvidos no autismo. Portanto, um dos objetivos desse trabalho foi obter astrócitos para realizar ensaios de co-cultura entre astrócitos e neurônios, manipulando as combinações de células entre controles e pacientes com TEA.

Os astrócitos produzidos tinham fenótipo específicos desse tipo celular, como expressão de GFAP, CD44, S100B, Vimentina e Sox2 e após essa confirmação foram iniciados os protocolos de interação com neurônios com vistas a avaliar influência dos astrócitos sobre os neurônios, por isso foram realizados 4 diferentes condições de cultivo, conforme descrito nos resultados, revelando que se o astrócito for “saudável”, ou seja, não for um astrócito autista, os neurônios de autistas podem recuperar sua condição de fenótipo alterado, se aproximando mais de um neurônio sem autismo, o que poderia ser considerado um resgate do fenótipo normal. Essa é a primeira vez que é reportado um resgate fenotípico neuronal através de um astrócito saudável. Este resultado traz uma informação embutida de que possivelmente são os astrócitos os responsáveis pelo autismo. Apesar de arriscada, essa informação também é inédita e tem ainda como reforço o resultado de indução do fenótipo “doente” aos neurônios WT, ou seja, neurônios sadios que foram cultivados sobre os astrócitos doentes também ficaram doentes. É claro que o estudo precisa ser aprofundado e resta agora investigar os mecanismos envolvidos na interação entre neurônios e astrócitos e também mecanismos de patogenicidade aos astrócitos. Estes achados, além de revelarem novos mecanismos da fisiopatologia do autismo, são muito importantes quando se pensa nas possíveis alternativas medicamentosas. Além disso, o inverso também é importante de ser considerado, pois como as causas do autismo não estão totalmente elucidadas, efeitos terapêuticos ou ambientais indesejáveis poderiam causar dano aos astrócitos causando patologias cujo comportamento remeta ao próprio autismo (BRISTOT SILVESTRIN et al., 2013).

Após a verificação experimental de que astrócitos “doentes” podem interferir na maturação e complexidade morfológica dos neurônios sadios, lembrando que o contrario também acontece, foram realizados ensaios funcionais para analisar os eventos sinápticos nas condições de co-cultivo, onde observamos os níveis de proteínas pré-sináptica, pós-sinápticas e colocalização entre elas. Nesse ensaio, quando neurônios de indivíduos controles eram cultivados sobre astrócitos de

pacientes com TEA havia uma diminuição significativa no nível de marcadores sinápticos, reforçando a observação anterior de que astrócitos de pacientes com TEA afetam neurônios normais, agora em relação a funcionalidade sináptica. Já no co-cultivo entre neurônios de pacientes com TEA e astrócitos de controles, foi possível observar um aumento significativo no nível de marcadores sinápticos, reforçando a hipótese de que astrócitos de indivíduos não autistas “recuperam” neurônios de pacientes com TEA em relação a funcionalidade sináptica.

Esses dados nunca foram mostrados anteriormente para autismo idiopático, já para pacientes com Síndrome de Rett as mesmas características foram observadas, onde os pesquisadores mostraram que os astrócitos de Rett afetam os neurônios derivados de controles (WILLIAMS et al., 2014). Esse trabalho reforça mais uma vez nossos achados e nossa hipótese da influência das células da glia sobre os neurônios.

Com esse trabalho e os resultados obtidos podemos dizer que é possível modelar o autismo idiopático *in vitro* pensando no resgate fenotípico e em futuras terapias para esses pacientes. Além disso podemos dizer que a tecnologia das células reprogramadas e modelagem de doenças abrem portas para novas descobertas. Esse foi só o início de uma longa jornada!

Conclusão

7 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos nesse trabalho podemos concluir que:

- * As células-tronco de dente decíduo esfoliado (SHED) apresentam uma boa eficiência de reprogramação celular e é uma excelente fonte para produção de iPSC e utilização na modelagem de doenças especialmente as neuropediátricas como é o caso do autismo;
- * As iPSC foram submetidas a protocolos de diferenciação neuronal onde os neurônios apresentaram expressão para marcadores específicos indicando sucesso da diferenciação;
- * Neurônios derivados de pacientes com TEA apresentaram um número menor de *spike*/segundo nos ensaios de eletrofisiologia quando comparados com os controles indicando menor atividade eletrofisiológica;
- * Neurônios de pacientes com TEA apresentam menos eventos sinápticos do que neurônios de controles;
- * As iPSC submetidas a diferenciação astrocítica apresentaram expressão para marcadores específicos indicando o sucesso na produção dos astrócitos;
- * Estabelecimento de co-cultura entre neurônios e astrócitos foi obtido com sucesso;
- * Neurônios de pacientes com TEA mostraram menos complexidade e maturação nas condições de co-cultivo quando comparados com neurônios dos controles;
- * Astrócitos de pacientes com TEA interferem na maturação e funcionalidade dos neurônios dos controles;

- * Astrócitos derivados de controles resgataram os fenótipos dos neurônios de pacientes com TEA;
- * Os resultados obtidos nos ensaios de co-cultura sugerem que os astrócitos influenciam na maturação, complexidade e funcionalidade dos neurônios, dados nunca mostrados anteriormente em pacientes com autismo idiopático;
- * A tecnologia das células reprogramadas é uma excelente ferramenta para a modelagem do autismo idiopático *in vitro* e abrirá portas para novas descobertas sobre o autismo.

Referências

REFERÊNCIAS

ABRAHAMSON, B. S.; GESCHWIND, D. H. Advances in autism genetics: on threshold of a new neurobiology. **Nature Reviews**, v.9, p.341-355, 2008.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION: Diagnostic criteria for autistic disorder. **In: Diagnostic and statistical manual of mental disorders. 5th ed.** Washington, D.C: American Psychiatric Association, 2013.

ASSAF, M.; JAGANNATHAN, K.; CALHOUN, V. D.; MILLER, L.; STEVENS, M. C.; SAHL, R.; O'BOYLE, J. G.; SCHULTZ, R. T.; PEARLSON, G. D. Abnormal functional connectivity of default mode sub-networks in autism spectrum disorder patients. **Neuroimage**, v.53, n.1, p.247-56, 2010.

BALLARD, C., GAUTHIER, S., CORBETT, A., BRAYNE, C., AARSLAND, D., JONES, E. Alzheimer's disease. **Lancet**, v.377, p.1019-1103, 2011.

BAMBINI-JUNIOR, V.; RODRIGUES, L.; BEHR, G. A.; MOREIRA, J. C.; RIESGO, R.; GOTTFRIED, C. Animal model of autism induced by prenatal exposure to valproate: behavioral changes and liver parameters. **Brain Research**, v.1408, p. 8-16, 2011.

BELTRAO BRAGA, P. C.; PIGNATARI, G. C.; MAIORA, P. C.; OLIVEIRA, N. A.; LIZIER, N. F.; WENCESLAU, C. V.; MIGLINO, M. A.; MUOTRI, A. R.; KERKIS, I. Feeder-free derivation of induced pluripotent stem cells from human immature dental pulp stem cells. **Cell transplantation**, v.20, n.11-12, p.1707-19, 2011.

BELTRÃO-BRAGA, P. C. B.; PIGNATARI, G. C.; RUSSO, F. B.; FERNANDES, I. R.; MUOTRI, A. R. Disease in a dish: induced pluripotent stem cells as a novel model for developmental disorders. **Cytometry Part A**, v.83, n.1, p.11-17, 2013.

BENVENUTO, A.; MOAVERO, R.; ALESSANDRELLI, R.; MANZI, B.; CURATOLO, P. Syndromic autism: causes and pathogenetic pathways. **World Journal of Pediatrics**, v.5, n.3, p.169-176, 2009.

BERG, R. Autism - an environmental health issue after all? **Journal of environmental health**, v.71, n.10, p.14-18, 2009.

BRENNAND, K. J.; SIMONE, A.; JOU, J.; GELBOIN-BURKHART, C.; SANGAR, S.; LI, Y.; MU, Y.; CHEN, G.; YU, D.; MCCARTHY, S.; SEBAT, J.; GAGE, F. H. Modelling schizophrenia using human induced pluripotent stem cells. **Nature**, v.473, n.7346, p. 221-225, 2011.

BRISTOT SILVESTRIN, R.; BAMBINI-JUNIOR, V.; GALLAND, F.; BOBERMIM, D. L.; QUINCOZES-SANTOS, A.; TORRES ABIB, R.; ZANOTTO, C.; BATASSINI, C.; BROLESE, G.; GONÇALVES, C. A.; RIESGO, R.; GOTTFRIED, C. Animal model of autism induced by prenatal exposure to valproate: altered glutamate metabolism in the hippocampus. **Brain Research**, v.1495, p52-60, 2013.

BROEK, J. A.; GUEST, P. C.; RAHMOUNE, H.; BAHN, S. Proteomic analysis of post mortem brain tissue from autism patients: evidence for opposite changes in prefrontal cortex and cerebellum in synaptic connectivity-related proteins. **Molecular Autism**, v. 5, p.41, 2014.

BLOCK, M. L.; CALDERÓN-GARCIDUENAS, L. Air pollution: mechanisms of neuroinflammation and CNS disease. **Trends Neuroscience**, v.32, p.506–516, 2009.

BLUMBERG, S. J.; BRAMLETT, M. D.; KOGAN, M. D.; SCHIEVE, L. A.; JONES, J. R.; LU, M. C. Changes in prevalence of parent-reported autism spectrum disorder in school-aged U.S. children: 2007 to 2011-2012. **National Health Statistics Report**, v. 65, p.1-11, 2013.

CALDERÓN-GARCIDUENAS, L.; MORA-TISCARENO, A.; ONTIVEROS, E.; GÓMEZ-GARZA, G.; BARRAGÁN-MEJÍA, G.; BROADWAY, J.; CHAPMAN, S.; VALENCIA-SALAZAR, G.; JEWELLS, V.; MARONPOT, R.R.; HENRÍQUEZ-ROLDÁN, C.; PÉREZ-GUILLÉ, B.; TORRES-JARDÓN, R.; HERRIT, L.; BROOKS, D.; OSNAYA-BRIZUELA, N.; MONROY, M. E.; GONZÁLEZ-MACIEL, A.; REYNOSO-ROBLES, R.; VILLAREAL-CALDERON, R.; SOLT, A. C.; ENGLE, R. W. Air pollution, cognitive deficits and brain abnormalities: a pilot study with children and dogs. **Brain and Cognition**, v.68, p.117–127, 2008.

COLANGELO, A. M.; ALBERGHINA, L.; PAPA, M. Astroglialosis as a therapeutic target for neurodegenerative diseases. **Neuroscience Letters**, v. 565, p. 59-64, 2014.

COURCHESNE, E.; PIERCE, K.; SCHUMANN, C. M.; REDCAY, E.; BUCKWALTER, J. A.; KENNEDY, D. P.; MORGAN, J. Mapping early brain development in autism. **Neuron**, v.56, n.2, p.399-413, 2007.

CHABOUB, L. S.; DENEEN, B. Astrocyte Form and Function in the Developing Central Nervous System. **Seminar in Pediatric Neurology**, v.20, n.4, p.230-235, 2013.

CHAMBERLAIN, S. J.; CHEN, P. F.; NG, K. Y.; BOURGOIS-ROCHA, F.; LEMTIRI-CHLIEH, F.; LEVINE, E. S.; LALANDE, M. Induced pluripotent stem cell models of the genomic imprinting disorders Angelman and Prader-Willi syndromes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of The USA**, v.107, n.41, p. 17668-73, 2010.

CHANG, T.; ZHENG, W.; TSARK, W.; BATES, S. E.; HUANG, H.; LIN, R. J.; YEE, J. K. Phenotypic Rescue of Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Motoneurons of a Spinal Muscular Atrophy Patient. **Stem Cells**, v.29, n.12, p.2090-2093, 2011.

CHEN, J.; LIN, M.; FOXE, J. J.; PEDROSA, E.; HRABOVSKY, A.; CARROLL, R.; ZHENG, D.; LACHMAN, H. M. Transcriptome comparison of human neurons generated using induced pluripotent stem cells derived from dental pulp and skin fibroblasts. **PLoS One**, v.8, n.10, p. e75682, 2013.

CHEUNG, A. Y.; HORVATH, L. M.; GRAFODATSKAYA, D.; PASCERI, P.; WEKSBERG, R.; HOTTA, A.; CARREL, L.; ELLIS, J. Isolation of MECP2-null Rett Syndrome patient hiPS cells and isogenic controls through X-chromosome inactivation. **Human Molecular Genetics**, v.20, n.11, p.2103-15, 2011.

DENCKLA, M. B. New diagnostic criteria for autism and related behavioral disorders: Guidelines for research protocols. **Journal of The American Academy of Child Psychiatry**, v.25, n.2, p.221-224, 1986.

DE ROSA, B. A.; VAN BAAREN, J. M.; DUBEY, G. K.; LEE, J. M.; CUCCARO, M. L.; VANCE, J. M.; PERICAK-VANCE, M. A.; DYKXHOORN, D. M. Derivation of autism spectrum disorder-specific induced pluripotent stem cells from peripheral blood mononuclear cells. **Neuroscience Letters**, v.516, n.1, p.9-14, 2012.

DE RUBEIS, S.; HE X, GOLDBERG, A. P.; POULTNEY, C. S.; SAMOCHA, K.; CICEK, A. E.; KOU, Y.; LIU, L.; FROMER, M.; WALKER, S.; SINGH, T.; KLEI, L.; KOSMICKI, J.; SHIH-CHEN, F.; ALEKSIC, B.; BISCALDI, M.; BOLTON, P. F.; BROWNFELD, J. M.; CAI, J.; CAMPBELL, N. G.; CARRACEDO, A.; CHAHROUR, M. H.; CHIOCCHETTI, A. G.; COON, H.; CRAWFORD, E. L.; CURRAN, S. R.; DAWSON, G.; DUKETIS, E.; FERNANDEZ, B. A.; GALLAGHER, L.; GELLER, E.; GUTER, S. J.; HILL, R. S.; IONITA-LAZA, J.; JIMENZ GONZALEZ, P.; KILPINEN, H.;

KLAUCK, S. M.; KOLEVZON, A.; LEE, I.; LEI, I.; LEI, J.; LEHTIMÄKI, T.; LIN, C. F.; MA'AYAN, A.; MARSHALL, C. R.; MCINNES, A. L.; NEALE, B.; OWEN, M. J.; OZAKI, N.; PARELLADA, M.; PARR, J. R.; PURCELL, S.; PUURA, K.; RAJAGOPALAN, D.; REHNSTRÖM, K.; REICHENBERG, A.; SABO, A.; SACHSE, M.; SANDERS, S. J.; SCHAFER, C.; SCHULTE-RÜTHER, M.; SKUSE, D.; STEVENS, C.; SZATMARI, P.; TAMMIMIES, K.; VALLADARES, O.; VORAN, A.; LI-SAN, W.; WEISS, L. A.; WILLSEY, A. J.; YU, T. W.; YUEN, R. K.; DDD STUDY; HOMOZYGOSITY MAPPING COLLABORATIVE FOR AUTISM; UK10K CONSORTIUM, COOK, E. H.; FREITAG, C. M.; GILL, M.; HULTMAN, C. M.; LEHNER, T.; PALOTIE, A.; SCHELLENBERG, G. D.; SKLAR, P.; STATE, M. W.; SUTCLIFFE, J. S.; WALSH, C. A.; SCHERER, S. W.; ZWICK, M. E.; BARETT, J. C.; CUTLER, D. J.; ROEDER, K.; DEVLIN, B.; DALY, M. J.; BUXBAUM, J. D. Synaptic, transcriptional and chromatin genes disrupted in autism. **Nature**, v.515, n.7526, p.209-215, 2014.

DIMOS, J. T.; RODOLFA, K. T.; NIAKAN, K. K.; WEISENTHAL, L. M.; MITSUMOTO, H.; CHUNG, W.; CROFT, G. F.; SAPHIER, G.; LEIBEL, R.; GOLAND, R.; WICHTERLE, H.; HENDERSON, C. E.; EGGAN, K. Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. **Science**, v.321, n.5893, p.1218-1221, 2008.

DURAND, C. M.; BETANCUR, C.; BOECKERS, T. M.; BOCKMANN, J.; CHASTE, P.; FAUCHEREAU, F.; NYGREN, G.; RASTAM, M.; GILLBERG, I. C.; ANCKARSÄTER, H.; SPONHEIM H.; GOUBRAN-BOTROS, H.; DELORME, R.; CHABANE, N.; MOUREN-SIMEONI, M. C.; DE MAS, P.; BIETH, E.; ROGÉ, B.; HÉRON, D.; BURGLIN, L.; GILLBERG, C.; LEBOYER, M.; BOURGERON, T. Mutations in the gene encoding the synaptic scaffolding protein SHANK3 are associated with autism spectrum disorders. **Nature Genetics**, v39, n.1, p. 25–27, 2007.

EBERT, A. D.; YU, J.; ROSE JR, F. F.; MATTIS, V. B.; LORSON, C. V.; THOMSON, J. A.; SVENDSEN, C. V. Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. **Nature**, n. 457, p. 277-280, 2009.

EDMONSON, C.; ZIATS, M. N.; RENNERT, O. M. Altered glial marker expression in autistic post-mortem prefrontal cortex and cerebellum. **Molecular Autism**, v.5, n.1, p. 3, 2014.

ESKES, C.; HONEGGER, P.; JUILLERAT-JEANNERET, L.; MONNET-TSCHUDI, F. Microglial reaction induced by noncytotoxic methylmercury treatment leads to neuroprotection via interactions with astrocytes and IL-6 release. **Glia**, v.37, n.1, p. 43-52, 2002.

FEIN, D., PENNINGTON, B., MARKOWITZ, P., BRAVERMAN, M., WATERHOUSE, L. Toward a neuropsychological model of infantile autism: are the social deficits primary? **Journal of American Academy of Child Psychiatry**, v.25, n.2, p.198–212, 1986.

FERNANDEZ-LIZARBE, S., PASCUAL, M., GUERRI, C. Critical role of TLR4 response in the activation of microglia induced by ethanol. **Journal of Immunology**, v.183, n.7, p. 4733-44, 2009.

FERNER, R. E. Post-mortem clinical pharmacology. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v.66, n.4, p.430-443, 2008.

FRICK, L. R.; WILLIAMS, K.; PITTENGER, C. Microglial dysregulation in psychiatric disease. **Clinical & Developmental Immunology**, 2013.

GEIER D. A, KERN, J. K, GEIER, M. R. A prospective cross-sectional cohort assessment of health, physical, and behavioral problems in autism spectrum disorders. **Maedica (Buchar)**, v.7, n.3, p.193-200, 2012.

GESCHWIND, D. H. Genetics of autism spectrum disorders. **Trends in Cognitive Science**, v.15, n.9, p.409-16, 2011.

GIBBONS, H. M., SMITH, A. M., TEOH, H. H., BERGIN, P. M., MEE, E. W., FAULL, R. L., DRAGUNOW, M. Valproic acid induces microglial dysfunction, not apoptosis, in human glial cultures. **Neurobiology of Diseases**, v.41, n.1, p. 96-103, 2011.

GILBERT C ; COLEMAN M. Autism and medical disorders: a review of the literature. **Developmental Medicine and Child Neurology**, v.38, n.3, p.191-202, 1996.

GUIZZETTI, M., MOORE, N. H., GIORDANO, G., VANDEMARK, K. L., COSTA, L. G. Ethanol inhibits neuritogenesis induced by astrocyte muscarinic receptors. **Glia**, v.58, n.12, p.1395–1406, 2010.

GROZEVA, D.; CARSS, K.; SPASIC-BOSKOVIC, O.; PARKER, M. J.; ARCHER, H.; FIRTH, H. V.; PARK, S. M.; CANHAM, N.; HOLDER, S. E.; WILSON, M.; HACKETT, A.; FIELD, M.; FLOYD, J. A.; UK10K CONSORTIUM, HURLES, M.; RAYMOND, F. L. De novo loss-of-function mutations in SETD5, encoding a methyltransferase in a 3p25 microdeletion syndrome critical region, cause intellectual disability. **American Journal of Human Genetics**, v.94, n.4, p.618-24, 2014.

GRABRUCKER, A. M. Environmental factors in autism. **Frontiers in Psychiatry**, v.3, p.118, 2012.

GRIESI-OLIVEIRA K.; ACAB, A.; GUPTA, A. R.; SUNAGA, D. Y.; CHAILANGKARN, T.; NICOL, X.; NUNEZ, Y.; WALKER, M. F.; MURDOCH, J. D.; SANDERS, S. J.; FERNANDEZ, T. V.; JI, W.; LIFTON, R. P.; VADASZ, E.; DIETRICH, A.; PRADHAN, D.; SONG, H.; MING, G. L.; GU, X.; HADDAD, G.; MARCHETTO, M. C.; SPITZER, N.; PASSOS-BUENO, M. R.; STATE, M. W.; MUOTRI, A. R. Modeling non-syndromic autism and the impact of TRPC6 disruption in human neurons. **Molecular Psychiatry**, 2014.

GRONTHOS, S.; MANKANI, M.; BRAHIM, J.; ROBEY, P. G.; SHI, S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) *in vitro* and *in vivo*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v.97, n.13625-13630, 2000.

GRZADZINSKI, R.; HUERTA, M.; LORD, C. DSM-5 and autism spectrum disorders (ASDs): an opportunity for identifying ASD subtypes. **Molecular Autism**, v.4, n.1, p. 12, 2013.

GLESSNER, J. T.; WANG, K.; CAI, G.; KORVATSKA, O.; KIM, C. E.; WOOD, S. Autism genome-wide copy number variation reveals ubiquitin and neuronal genes. **Nature**, v.459, n.7246, p.569-734, 2009.

HA, A. D.; FUNG, V. S. Huntington's disease. **Current Opinion in Neurology**, v.25, n.4, p.491-498, 2012.

IMAIZUMI, Y.; OKADA, Y.; AKAMATSU, W.; KOIKE, M.; KUZUMAKI, N.; HAYAKAWA, H.; NIHIRA, T.; KOBAYASHI, T.; OHYAMA, M.; SATO, S.; TAKANASHI, M.; FUNAYAMA, M.; HIRAYAMA, A.; SOGA, T.; HISHIKI, T.; SUEMATSU, M.; YAGI, T.; ITO, D.; KOSAKAI, A.; HAYASHI, K.; SHOUJI, M.; NAKANISHI, A.; SUZUKI, N.; MIZUNO, Y.; MIZUSHIMA, N.; AMAGAI, M.; UCHIYAMA, Y.; MOCHIZUKI, H.; HATTORI, N.; OKANO, H. Mitochondrial dysfunction associated with increased oxidative stress and alpha-synuclein accumulation in PARK2 iPSC-derived neurons and postmortem brain tissue. **Molecular Brain**, v.5, p.35, 2012.

IOSSIFOV, I.; O'ROAK, B. J.; SANDERS, S. J.; RONEMUS, M.; KRUMM, N.; LEVY, D.; STESSMAN, H. A.; WITHERSPOON, K. T.; VIVES, L.; PATTERSON, K. E., SMITH, J. D.; PAEPER, B.; NICKERSON, D. A.; DEA, J.; DONG, S.; GONZALEZ, L. E.; MANDELL, J. D.; MANE, S. M.; MURTHA, M. T.; SULLIVAN, C. A.; WALKER, M. F.; WAQAR, Z.; WEI, L.; WILLSEY, A. J.; YAMROM, B.; LEE, Y. H.; GRABOWSKA, E.; DALKIC, E.; WANG, Z.; MARKS, S.; ANDREWS, P.; LEOTTA, A.; KENDALL, J.; HAKKER I, ROSENBAUM J, MA B, RODGERS L, TROGE J, NARZISI G, YOON S, SCHATZ, M. C, YE, K.; MCCOMBIE, W. R, SHENDURE, J.; EICHLER, E. E, STATE, M. W, WIGLER, M. The contribution of de novo coding mutations to autism spectrum disorder. **Nature**, v.515, n.7526, p.216-21, 2014.

JOHNSON, M. A.; WEICK, J. P.; PEARCE, R. A.; ZHANG, S. C. Functional neural development from human embryonic stem cells: accelerated synaptic activity via astrocyte coculture. **Journal Neuroscience**, v.27, n.12, p.3069-3077, 2007.

KANNER, L. Autistic disturbances of affective contact. **Nervous Child**, v.2, p.217–250, 1943.

KAPLAN, H. I.; SADOCK, B. J.; GREBB, J. A. Compêndio de Psiquiatria – Ciências do Comportamento e Psiquiatria Clínica. 9ª ed. Porto Alegre: **Artmed**; 2007.

KERN, J. K.; GEIER, D. A.; AUDHYA, T.; KING, P. G.; SYKES, L. K.; GEIER, M. R. Evidence of parallels between mercury intoxication and the brain pathology in autism. **Acta Neurobiologiae Experimentalis**, v.72, n.2, p.113-53, 2012.

KIM, H. G. L.; KISHIKAWA, S.; HIGGINS, A. W.; SEONG, I.; DONOVAN, D. J.; SHEN, Y.; LALLY, E.; WEISS, L. A.; NAJM, L. Disruption of neurexin 1 associated with autism spectrum disorder. **American Journal of Human Genetics**, v.82, n.1, 199-207, 2008.

KIM, S.; WEBSTER, M. J. Postmortem brain tissue for drug discovery in psychiatric research. **Schizophrenia Bulletin**, v.35, n.6, p.1031-3, 2009.

KIM, D. S.; ROSS, P. J.; ZASLAVSKY, K.; ELLIS, J. Optimizing neuronal differentiation from induced pluripotent stem cells to model ASD. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v.8, p.109, 2014.

KONDO, T.; ASAI, M.; TSUKITA K, KUTOKU, Y.; OHSAWA, Y.; SUNADA, Y.; IMAMURA, K.; EGAWA, N.; YAHATA, N.; OKITA, K.; TAKAHASHI, K.; ASAKA, I.; AOI, T.; WATANABE, A.; WATANABE, K.; KADOYA, C.; NAKANO, R.; WATANABE, D.; MARUYAMA, K.; HORI, O.; HIBINO, S.; CHOSHI, T.; NAKAHATA, T.; HIOKI, H.; KANEKO, T.; NAITOH, M.; YOSHIKAWA, K.; YAMAWAKI, S.; SUZUKI, S.; HATA, R.; UENO, S.; SEKI, T.; KOBAYASHI, K.; TODA, T.; MURAKAMI, K.; IRIE, K.; KLEIN, WL.; MORI, H.; ASADA, T.; TAKAHASHI, R.; IWATA, N.; YAMANAKA, S.; INOUE, H. Modeling Alzheimer's disease with iPSCs reveals stress phenotypes associated with intracellular A β and differential drug responsiveness. **Cell Stem Cell**, v.12, n.4, p. 487-496, 2013.

LEE, G.; PAPAPETROU, E. P.; KIM, H.; CHAMBERS, S. M.; TOMISHIMA, M. J.; FASANO, C. A.; GANAT, Y. M.; MENON, J.; SHIMIZU, F.; VIALE, A.; TABAR, V.; SADELAIN, M.; STUDER, L. Modelling pathogenesis and treatment of familial dysautonomia using patient-specific iPSCs. **Nature**, v.461, n.7262, p.402-406, 2009.

LEES, A. J.; HARDY, J.; REVESZ, T. Parkinson's disease. **Lancet**, v.373, n.9680, p. 2055-2066, 2009.

LI, H. L.; FUJIMOTO, N.; SASAKAWA, N.; SHIRAI, S.; OHKAME, T.; SAKUMA, T.; TANAKA, NAOKI AMANO, M.; WATANABE, A.; SAKURAI, H.; YAMAMOTO, T.; YAMANAKA, S.; HOTTA, A. Precise Correction of the Dystrophin Gene in Duchenne Muscular Dystrophy Patient Induced Pluripotent Stem Cells by TALEN and CRISPR-Cas9. **Stem Cell Reports**, v.4, n.1, p.143–154, 2015.

LIEU, P. T.; FONTES, A.; VEMURI, M. C.; MACARTHUR, C. C. Generation of induced pluripotent stem cells with CytoTune, a non-integrating Sendai virus. **Methods in Molecular Biology**, v.997, p.45-56, 2013.

LIU, M.; CHOI, D. Y.; HUNTER, R. L.; PANDYA, J. D.; CASS, W. A.; SULLIVAN, P. G.; KIM, H. C.; GASH, D. M.; BING, G. Trichloroethylene induces dopaminergic neurodegeneration in Fisher 344 rats. **Journal of Neurochemistry**, v.112, n.3, p. 773-783, 2010.

MATYASH, V.; KETTENMANN, H. Heterogeneity in astrocyte morphology and physiology. **Brain Research. Reviews**, v.63, n.1-2, p.2-10, 2010.

MARCHETTO, M. C.; MOUTRI, A. R.; SMITH, A. M.; CEZER, G. G.; GAGE, F. H. Non-cell-autonomous effect of human SOD1 G37R astrocytes on motor neurons derived from human embryonic stem cells. **Cell Stem Cell**, v.3, n.6, p.649-57, 2008.

MARCHETTO, M. C.; CARROMEU, C.; ACAB, A.; YU, D.; YEO, G. W.; MU, Y.; CHEN, G.; GAGE, F. H.; MUOTRI, A. R. A Model for Neural Development and Treatment of Rett Syndrome Using Human Induced Pluripotent Stem Cells. **Cell**, v. 143, n.4, p.527-39, 2010.

MEFFORD, H. C.; BATSHAW, M. L.; HOFFMAN, E. P. Genomics, intellectual disability, and autism. **The New England Journal of Medicine**, v.366, n.8, p. 733-743, 2012.

MIURA, M.; GRONTHOS, S.; ZHAO, M.; LU, B.; FISHER, L. W.; ROBEY, P. G, SHI, S.; SHED I. Stem cell from human exfoliated deciduous teeth. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v.100, n.10, p.5807-5812, 2003.

MOORE, S.J.; TURNPENNY, P.; QUINN, A.; GLOVER, S.; LLOYD, D.J.; DEAN, J.C. A clinical study of 57 children with fetal anticonvulsant syndromes. **Journal of Medical Genetics**, v.37, n.7, p.489-97, 2000.

NANSON, J. L. Autism in fetal alcohol syndrome: a report of six cases. **Alcoholism Clinical and Experimental Research**, v.16, n.3, p.558–565, 1992.

OBERHEIM, N. A.; TAKANO, T.; HAN, X.; HE, W.; LIN, J. H.; WANG, F.; XU, Q.; WYATT, J. D.; PILCHER, W.; OJEMANN, J. G.; RANSOM, B. R.; GOLDMAN, S. A.; NEDERGAARD, M. Uniquely hominid features of adult human astrocytes. **The Journal of Neuroscience**, v.29, n.10. p.3276–3287, 2009.

PALMER, R. F.; BLANCHARD, S.; WOOD, R. Proximity to point sources of environmental mercury release as a predictor of autism prevalence. **Health Place**, v. 15, n.1, p.18-24, 2009.

PASÇA, S. P.; PORTMANN, T.; VOINEAGU, I.; YAZAWA, M.; SHCHEGLOVITOV, A.; PASÇA, A. M.; CORD, B.; PALMER, T. D.; CHIKAHISA, S.; NISHINO, S.; BERNSTEIN, J. A.; HALLMAYER, J.; GESCHWIND, D. H.; DOLMETSCH, R. E. Using iPSC-derived neurons to uncover cellular phenotypes associated with Timothy syndrome. **Nature Medicine**, v.17, n.12, p.1657-1662, 2011.

PEKNY, M.; WILHELMSSON, U.; PEKNA, M. The dual role of astrocyte activation and reactive gliosis. **Neuroscience Letters**, v.565, p.30- 38, 2014.

PINTO, D.; DELABY, E.; MERICO, D.; BARBOSA, M.; MERIKANGAS, A.; KLEI, L.; THIRUVAHINDRAPURAM, B.; XU, X.; ZIMAN, R.; WANG, Z.; VORSTMAN, J. A.; THOMPSON, A.; REGAN, R.; PILORGE, M.; PELLECCIA, G. et al. Convergence of genes and cellular pathways dysregulated in autism spectrum disorders. **American Journal of Human Genetics**, v.94, n.5, p.677-94, 2014.

PORTAL BRASIL. **Economia e emprego**: população brasileira ultrapassa 202 milhões de pessoas. 2014. Disponível em: < <http://www.brasil.gov.br/governo/2014/08/populacao-brasileira-ultrapassa-202-milhoes-de-pessoas>>. Acesso em: 25 jan. 2014.

PHILLIPS, M.; POZZO-MILLER, L. Dendritic spine dysgenesis in autism related disorders. **Neuroscience Letters**, 2015

PRILUTSKY, D.; PALMER, N. P.; SMEDEMARK-MARGULIES, N.; SCHLAEGER, T. M.; MARGULIES, D. M.; KOHANE, I. S. iPSC-derived neurons as a higher-throughput readout for autism: promises and pitfalls. **Trends in Molecular Medicine**, v.20, n.2, p.91-104, 2014.

QUAAK, I.; BROUNS, M. R.; VAN DE BOR, M. The dynamics of autism spectrum disorders: how neurotoxic compounds and neurotransmitters interact. **International Journal Environ Research. Public Health**, v.10, n.8, p.3384-3408, 2013.

REDCAY, E. ; COURCHESNE, E. When is the brain enlarged in autism? A metaanalysis of all brain size reports. **Biol Psychiatry** , v.58, p.1–9, 2005.

ROOHI, J.; MONTAGNA, C.; TEGAY, D. H.; PALMER, L. E.; DEVINCENT, C.; POMEROY, J. C.; CHRISTIAN, S. L.; NOWAK, N.; HATCHWELL, E. Disruption of contactin 4 in three subjects with autism spectrum disorder. **Journal of Medical Genetics**, v.46, n.3, p.176-182, 2009.

ROSS, P. J.; ELLIS, J. Modeling complex neuropsychiatric disease with induced pluripotent stem cells. **F1000 biology reports**, v.2, p.84, 2010.

RUTTER, M. Diagnosis and definition of childhood autism. **Journal of Autism and Childhood Schizophrenia**, v.8, n.2, p.139–161, 1978.

SAJDEL-SULKOWSKA, E. M.; XU, M.; MCGINNIS, W.; KOIBUCHI, N. Brain region specific changes in oxidative stress and neurotrophin levels in autism spectrum disorders (ASD). **Cerebellum**, v.10, n.1, p.43–48, 2011.

SÁNCHEZ-DANÉS, A.; RICHAUD-PATIN, Y.; CARBALLO-CARBAJAL, I.; JIMÉNEZ-DELGADO, S.; CAIG, C.; MORA, S.; DI GUGLIELMO, C.; EZQUERRA, M.; PATEL, B.; GIRALT, A.; CANALS, J. M.; MEMO, M.; ALBERCH, J.; LÓPEZ-BARNEO, J.; VILA, M.; CUERVO, A. M.; TOLOSA, E.; CONSIGLIO, A.; RAYA, A. Disease-specific phenotypes in dopamine neurons from human iPS-based models of genetic and sporadic Parkinson's disease. **EMBO Molecular Medicine**, v.4, n.5, p.380-395, 2012.

SCHMIDT, M. M.; ROHWEDDER, A.; DRINGEN, R. Effects of chlorinated acetates on the glutathione metabolism and on glycolysis of cultured astrocytes. **Neurotoxicity Research**, v.19, n.4, p.628-637, 2011.

SHCHEGLOVITOV, A.; SHCHEGLOVITOVA, O.; YAZAWA, M.; PORTMANN, T.; SHU, R.; SEBASTIANO, V.; KRAWISZ, A.; FROELICH, W.; BERNSTEIN, J. A.; HALLMAYER, J. F.; DOLMETSCH, R. E. SHANK3 and IGF1 restore synaptic deficits in neurons from 22q13 deletion syndrome patients. **Nature**, v.503, n.7475, p. 267-271, 2013.

SPOOREN, W.; LINDEMANN, L.; GHOSH, A.; SANTARELLI, L. Synapse dysfunction in autism: a molecular medicine approach to drug discovery in neurodevelopmental disorders. **Trends in Pharmacological Science**, v. 33, n.12, p.669-684, 2012.

STAHL-ZENG, J.; LANGE, V.; OSSOLA, R.; ECKHARDT, K.; KREK, W.; AEBERSOLD, R.; DOMON, B. High sensitivity detection of plasma proteins by multiple reaction monitoring of N-glycosites. **Molecular & Cellular Proteomics**, v.6, n.10, p.1809-1817, 2007.

STATE MW, LEVITT P. The conundrums of understanding genetic risks for autism spectrum disorders. **Nature Neuroscience**, v.14, n.12, p.1499-1506, 2011.

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

TAKAHASHI, K.; TANABE, K.; OHNUKI, M.; NARITA, M.; ICHISAKA, T.; TOMODA, K.; YAMANAKA, S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. **Cell**, v.131, n.5, p.861-872, 2007.

TSANKOVA, N.; RENTHAL, W.; KUMAR, A.; NESTLER, E. J. Epigenetic regulation in psychiatric disorders. **Nature Review Neuroscience**, v.8, n.5, p.355-67, 2007.

TANIA M, KHAN MA, XIA K. Recent advances in animal model experimentation in autism research. **Acta Neuropsychiatrica**. V.26, n.5, p.264-271, 2014.

TUCHMAN, R.; RAPIN, I. Autismo-abordagem neurobiológica, Porto Alegre, **Artmed**, 2009.

URBACH, A.; BAR-NUR, O.; DALEY, G. Q.; BENVENISTY, N. Differential modeling of fragile X syndrome by human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. **Cell Stem Cell**, v.6, n.5, p.407-11, 2010.

VOINEAGU, I.; WANG, X.; JOHNSTON, P.; LOWE, J. K.; TIAN, Y.; HORVATH, S.; MILL, J.; CANTOR, R. M.; BLENCOWE, B. J.; GESCHWIND, D. H. Transcriptomic analysis of autistic brain reveals convergent molecular pathology. **Nature**, v.474, n. 7351, p.380-384, 2011.

WALDMAN, M.; NICHOLSON, S.; ADILOV, N.; WILLIAMS, J. Autism prevalence and precipitation rates in California, Oregon, and Washington counties. **Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine**, v.162, n.11, p.1026-1034, 2008.

WANG, C., LUAN, Z., YANG, Y., WANG, Z., CUI, Y., GU, G. Valproic acid induces apoptosis in differentiating hippocampal neurons by the release of tumor necrosis factor- from activated astrocytes. **Neuroscience Letters**, v.497, n.2, p.122-127, 2011.

WEE, C. Y.; WANG, L.; SHI, F.; YAP, P. T.; SHEN, D. Diagnosis of autism spectrum disorders using regional and interregional morphological features. **Hum Brain Mapping**, v.35, n.7, p.3414-3430, 2014.

WILLIAMS, E. C.; ZHONG, X.; MOHAMED, A.; LI, R., LIU, Y.; DONG, Q.; ANANIEV, G. E.; MOK, J. C.; LIN, B. R.; LU, J.; CHIAO, C.; CHERNEY, R.; LI, H.; ZHANG, S. C.; CHANG, Q. Mutant astrocytes differentiated from Rett syndrome patients-

specific iPSCs have adverse effects on wild-type neurons. **Human Molecular Genetics**, v.23, n.11, p.2968-2980, 2014.

XIE, Y. Z.; ZHANG, R. X. Neurodegenerative diseases in a dish: the promise of iPSC technology in disease modeling and therapeutic discovery. **Neurological Sciences**, v.36, n.1, p.21-27, 2015.

YANG, Z.; YANG, S.; QIAN, S. Y.; HONG, J. S., KADIISKA, M. B., TENNANT, R. W., WAALKES, M. P., LIU, J. Cadmium-induced toxicity in rat primary mid-brain neuroglia cultures: role of oxidative stress from microglia. **Toxicological Sciences**, v.98, n.2, p.488-94, 2007.

YU, D. X.; DI GIORGIO, F. P.; YAO, J.; MARCHETTO, M. C.; BRENNAND, K.; WRIGHT, R.; MEI, A.; MCHENRY, L.; LISUK, D.; GRASMICK, J. M.; SILBERMAN, P.; SILBERMAN, G.; JAPPELLI, R.; GAGE, F. H. Modeling hippocampal neurogenesis using human pluripotent stem cells. **Stem Cell Reports**, v.2, n.3, p. 295-310, 2014.

ZHANG, Y.; BARRES, B. A. Astrocyte heterogeneity: an underappreciated topic in neurobiology. **Current Opinion in Neurobiology**, v.20, n.5, p.588-594, 2010.

ZHANG, N.; AN, M. C.; MONTORO, D.; ELLERBY, L. M. Characterization of human Huntington's disease cell model from induced pluripotent stem cells. **PLoS Currents**, v.2, p.Rrn1193, 2010

ZEIDÁN-CHULIÁ, F.; GURSOY, U. K.; KÖNÖNEN, E.; GOTTFRIED, C. A dental look at the autistic patient through orofacial pain. **Acta Odontologica Scandinavica**, v. 69, n.4, p.193-200, 2011.

ZEIDÁN-CHULIÁ, F.; RYBARCZYK-FILHO, J. L.; SALMINA, A. B.; DE OLIVEIRA, B. H.; NODA, M.; MOREIRA, J. C. Exploring the multifactorial nature of autism through computational systems biology: calcium and the Rho GTPase RAC1 under the spotlight. **Neuromolecular Medicine**, v.15, n.2, p.364-383, 2013.

ZEIDÁN-CHULIÁ, F.; SALMINA, A. B.; MALINOVSKAYA, N. A.; NODA, M.; VERKHRATSKY, A.; MOREIRA, J. C. The glial perspective of autism spectrum disorders. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v.38, p.160-72, 2014.