Yasmin Rana de Miranda Silva

**Estabelecimento de neurônios serotoninérgicos e organoides cerebrais como
modelos *in vitro* para o estudo do Transtorno Depressivo Maior**

**Establishment of serotonergic neurons and cerebral organoids as *in vitro*
models to study Major Depressive Disorder**

São Paulo
2018

Yasmin Rana de Miranda Silva

Estabelecimento de neurônios serotoninérgicos e organoides cerebrais como modelos *in vitro* para o estudo do Transtorno Depressivo Maior

Establishment of serotonergic neurons and cerebral organoids as *in vitro* models to study Major Depressive Disorder

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção de Título de Mestre em Ciências, na Área de Biologia – Genética

Orientadora: Profa. Dra. Lygia da Veiga Pereira

EXEMPLAR CORRIGIDO - O original encontra-se disponível no Instituto de Biociências da USP

São Paulo
2018

Ficha Catalográfica

	<p>Rana-de-Miranda, Yasmin</p> <p>Estabelecimento de neurônios serotoninérgicos e organoides cerebrais como modelos <i>in vitro</i> para o estudo do Transtorno Depressivo Maior</p> <p>85 p.</p> <p>Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.</p> <p>1. Transtorno Depressivo Maior 2. Neurônios serotoninérgicos 3. Organoides cerebrais I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva .</p>	
--	---	--

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Profa. Dra. Lygia da Veiga Pereira
Orientadora

*Dedico esta dissertação à minha família:
minha mãe e avó, fontes de inspiração,
força e amor.*

*A normalidade é uma estrada pavimentada: é cômodo
para caminhar, mas nunca crescerão flores nela.*

Vincent Van Gogh

Agradecimentos

À minha mãe e minha avó, pelo amor incondicional, carinho e dedicação com que me criaram. Sem todo o apoio e compreensão que me deram eu não conseguiria ser absolutamente nada do que sou hoje e nem ter conquistado tudo o que conquistei até agora. Saber que eu tenho um porto seguro no qual eu posso confiar é muito reconfortante. Minha mãe é um anjo que está sempre ao meu lado e a quem também nunca deixarei desamparada. Infelizmente minha avó não está mais fisicamente comigo, mas tenho certeza que de alguma maneira ela continua presente.

Aos meus amigos, que têm me acompanhado durante esta jornada de aprimoramento pessoal e profissional. No desenvolvimento de uma dissertação de mestrado, o trabalho e esforço são imensamente importantes, mas sem estabilidade emocional não seria possível eu ter finalizado todas minhas metas com sucesso. Agradeço a todos que me acompanharam pela paciência, compreensão, por terem aguentados meus dias difíceis, que não foram poucos, e por terem me proporcionado momentos de enorme alegria, que fazem a vida valer a pena. Ao Flávio, por todo o apoio nos momentos de dificuldade e tristeza, por estar sempre presente para me ajudar no que eu precisasse e por todas as risadas e momentos incríveis que tivemos. Ao Will, por sempre estar disposto a me ouvir, dar conselhos e me ajudar de infindáveis maneiras. Por todas as conversas filosóficas, sacadas divertidas e por me fazer acreditar mais em mim mesma. Ao Diego, por toda a paciência, conselhos, dicas e ajuda em momentos críticos. Sem esse apoio a conclusão desse trabalho não seria possível. À Lívia, que além de ser uma pessoa linda e uma amiga muito querida, é uma profissional sem igual, a quem eu admiro e respeito muito. É outra pessoa sem a qual este trabalho não seria possível. À Michele, que possui uma força enorme e, apesar de ter seus momentos difíceis, sempre esteve disposta a me ouvir, me ajudar e compartilhar altas risadas. À Cíntia, que apesar de estar fisicamente longe, sempre me fez muito bem com conversas, conselhos, apoio em momentos difíceis e muito humor. Ao Gustavo, fonte de infindável paciência pra aguentar minhas reclamações, apoio e ajuda em momentos bem complicados. É outra pessoa sem a qual essa dissertação não teria se concretizado. Ao Marzi, pelas longas conversas filosóficas, momentos de apoio, preocupação e por estimular meu senso crítico. À Kaísa, por sua força e vibe maravilhosa. À Agata, pelas conversas, conselhos e momentos de descontração. Ao Lucas, que me ajudou em muitos momentos críticos desse mestrado e possui uma energia muito boa. Ao Wellington, por todos os conselhos, dicas e risadas. À Maria Cristina, que me ajudou muitas vezes a manter o equilíbrio e a ter pensamentos mais positivos. À Karen, pela amizade que ainda perdura. Ao

Pablo, pelos momentos de racionalidade e conselhos dados. Ao Adriano, pelas conversas interessante e enriquecedoras. Ao Osni, pela preocupação e apoio. À Teté, pelas dicas e paciência ao me ouvir. À Bianca, que mesmo eu tendo acabado de conhecer já me ajudou imensamente. À minhas amigas Marcela, Hayfa, Elaine, Cris, Duda e Olga pelos momentos leves, alegres e por estarem sempre presentes. À Lillian, Vivi, Gege, Betinho e Ed pelos momentos divertidíssimos e de descontração. A todos os amigos que fiz no ambiente da dança. Sem os momentos de leveza que me proporcionaram, o caminho teria sido ainda mais árduo.

À minha orientadora, prof^a Lygia, pelo acolhimento inicial, quando eu ainda estava na iniciação científica, pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório durante o mestrado e por me proporcionar um intenso crescimento pessoal e profissional.

À toda equipe do laboratório LaNCE-SP, em especial Fabiano, Luís, Raquel, Yordanka, Simone e Ana Patrícia por todos os ensinamentos e auxílios

À toda a equipe do laboratório LaNCE-RJ, em especial ao prof. Stevens e ao Marcelinho pelos ensinamentos e pelo maravilhoso período que me proporcionaram.

A todas as pessoas de outros laboratórios envolvidos neste projeto: Dani, Ana Regina, Prof. Henning, May, Thiago e prof. Aldo pelos auxílios.

Ao prof. Gilberto, pelas discussões sobre a vida acadêmica, por ter despertado meu interesse pela neurociência e estimulado meu senso crítico.

A todos do laboratório de Neurogenética da UFABC, em especial ao prof. Alexandre, prof. Sílvia, Vera, Felipe, Débora e Marília por toda a ajuda e apoio em um momento crítico da minha jornada.

Ao Departamento de Genética e Biologia Evolutiva do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, pelos recursos para realização deste projeto.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro (Processo CNPq: 130258/2016-4)

A todos que passaram pela minha vida e de alguma maneira contribuíram para meu enriquecimento pessoal e profissional.

RESUMO

RANA-DE-MIRANDA, Y. Universidade de São Paulo, agosto de 2018 **Estabelecimento de neurônios serotoninérgicos e organoides cerebrais como modelos *in vitro* para o estudo do Transtorno Depressivo Maior**. Orientadora: Lygia da Veiga Pereira.

O Transtorno Depressivo Maior (TDM) é uma condição neuropsiquiátrica que resulta em um substancial sofrimento pessoal, incapacidade e custos sociais. Devido à inacessibilidade ao encéfalo humano por questões práticas, éticas e às limitações encontradas pelo uso de modelos animais, o desenvolvimento de modelos *in vitro* acurados torna-se fundamental para o estudo desta doença. Neste aspecto, o surgimento da tecnologia de células-tronco pluripotentes induzidas humanas (hiPSCs) apresenta-se como uma importante ferramenta, uma vez que permite a recapitulação da diversidade genética dos pacientes e possibilita a produção de tipos celulares de interesse para o estudo da doença, como neurônios e glia. Entretanto, até o momento, não há registros da produção de modelos *in vitro* a partir de hiPSCs de pacientes com TDM. Visando preencher esta lacuna, o presente estudo teve por objetivo a produção e caracterização de dois tipos de modelos *in vitro* a partir de hiPSCs de pacientes com TDM: neurônios serotoninérgicos, uma cultura celular em monocamada, e organoides cerebrais, uma cultura celular em suspensão. 5 linhagens de hiPSCs de pacientes foram diferenciadas em neurônios com sucesso e no ensaio de imunocitoquímica, expressaram os marcadores 5-HT (serotonina), T5-HT (transportador de serotonina), nestina (presente em diferentes tipos de células neuronais) e Tuj1 (proteína do citoesqueleto, neurônio-específica), confirmando o fenótipo de neurônios serotoninérgicos. As células diferenciadas obtiveram também resultados positivos nos testes de imageamento de cálcio e de medidas da alteração no potencial de membrana, indicando que os neurônios diferenciados eram fisiologicamente funcionais. De 5 linhagens de hiPSCs (sendo uma controle e as outras 4 de pacientes com TDM), somente 1 linhagem sobreviveu ao processo de diferenciação, originando organoides cerebrais e apresentou expressão dos marcadores Sox2 (progenitoras neurais) e Tuj1 (neurônios maduros), indicando ainda uma estruturação correta da citoarquitetura, com as progenitoras localizadas mais internamente, na zona ventricular, ao redor dos lúmens preenchidos com líquido e com os neurônios maduros localizados na placa cortical, região mais externa dos agregados celulares. Apesar de o processo de produção dos organoides cerebrais necessitar de aperfeiçoamento e melhor padronização, a

produção destes dois tipos de modelos *in vitro*, feitos a partir de hiPSCs de pacientes com TDM configura-se como um importante passo para a futura redução do uso de modelos animais em pesquisa, elucidação de mecanismos subjacentes à doença, identificação de biomarcadores diagnósticos e triagem de fármacos de maneira personalizada, visando permitir tratamentos mais baratos, adequados e eficientes para o TDM.

ABSTRACT

RANA-DE-MIRANDA, Y. University of São Paulo, in august 2018 **Establishment of serotonergic neurons and cerebral organoids as *in vitro* models to study Major Depressive Disorder.**
Advisor: Lygia da Veiga Pereira.

Major Depressive Disorder (MDD) is a neuropsychiatric condition that results in substantial personal distress, disability, and social costs. The inaccessibility to the human brain due to practical and ethical issues and the limitations encountered by the use of animal models turn the development of accurate *in vitro* models into an essential factor to study this disease. In this regard, the emergence of human induced pluripotent stem cell technology (hiPSCs) is an important tool, since it allows the recapitulation of patient's genetic diversity and allows the production of cell types of interest for studying the disease, such as neurons and glia. However, to date, there are no records of the production of *in vitro* models from hiPSCs of patients with MDD. In order to fill this gap, the present study aimed at the production and characterization of two types of *in vitro* models from hiPSCs of patients with MDD: serotonergic neurons, a monolayer cell culture, and cerebral organoids, a suspension cell culture. 5 patients' hiPSCs lines were successfully differentiated into neurons and, in the immunocytochemistry assay, they expressed the 5-HT (serotonin), T5-HT (serotonin transporter), nestin (present in several neuronal cell types) and Tuj1 (cytoskeleton protein, neuron-specific), confirming the phenotype of serotonergic neurons. Differentiated cells also obtained positive results in calcium imaging tests and measurements of membrane potential changes, indicating that differentiated neurons were physiologically functional. Of 5 hiPSCs lines (one control and the other 4 of patients with MDD), only 1 survived to the differentiation process, originating cerebral organoids which presented expression of Sox2 (neural progenitor) and Tuj1 (mature neurons) markers and a correct structuring of the cytoarchitecture, with the progenitors located more internally in the ventricular zone, around the lumens filled with liquid and with the mature neurons located in the cortical plate, the outermost region of the cellular aggregates. Although the cerebral organoids production process needs improvement and better standardization, the production of these two types of *in vitro* models, made from hiPSCs of patients with MDD, is an important step for the future reduction of animal models use, elucidation of

disease underlying mechanisms, identification of diagnostic biomarkers and drug screening in a personalized manner, in order to allow cheaper, more adequate and more efficient treatments for MDD.

Keywords: Major Depressive Disorder, Serotonergic Neuron, Cerebral organoid, Induced pluripotent stem cell, *in vitro* model

Lista de Figuras

Figura 1. Regiões encefálicas envolvidas no TDM..	21
Figura 2. Regulação de plasticidade e crescimento neurais pela monoamina 5-HT.	22
Figura 3. Mecanismo de funcionamento dos SSRIs.	23
Figura 4. Produção de hiPSCs e suas aplicações.	28
Figura 5. Possibilidades de diferenciação das NSCs.	32
Figura 6. Estabelecimento de identidade neural para as células e organização estrutural 3D.	34
Figura 7. Desenvolvimento do encéfalo humano comparado ao de organoides cerebrais.	35
Figura 8. Período de desenvolvimento encefálico humano em comparação ao de organoides.	36
Figura 9. Neurogênese no encéfalo humano comparativamente à de camundongo.	38
Figura 10. Desenho experimental de produção dos modelos <i>in vitro</i> .	41
Figura 11. Protocolo de diferenciação serotoninérgica.	44
Figura 12. Protocolo de diferenciação de iPSCs em organoides cerebrais.	48
Figura 13. Revestimento dos organoides cerebrais com Matrigel.	48
Figura 14. Protocolo de diferenciação de iPSCs em organoides cerebrais.	49
Figura 15. Exemplos de morfologia correta em cada etapa de diferenciação dos organoides cerebrais.	50
Figura 16. Progresso da diferenciação serotoninérgica das iPS 32, 34, 64, 65 e 68 nos dias 0, 15 e 39.	52
Figura 17. Imunocitoquímica demonstrando a expressão de 5-HT para iPS32, 34, 64, 65 e 68.	54
Figura 18. Imunocitoquímica demonstrando a expressão de 5-HT para iPS32, 34, 64, 65 e 68.	55
Figura 19. Imunocitoquímica demonstrando a expressão de Nestina para iPS32, 34, 64, 65 e 68.	56
Figura 20. Imunocitoquímica demonstrando a expressão de Tuj1 para iPS32, 34, 64, 65 e 68.	57
Figura 21. Atividade neuronal medida por influxo de cálcio induzido por NMDA.	58
Figura 22. Atividade neuronal medida por ensaios de potencial de membrana.	59

Figura 23. Linhagens de hiPSCs que não geraram organoides.....	60
Figura 24. Progressão do desenvolvimento dos organoides da linhagem iPS50.	60
Figura 25. Imunocitoquímica demonstrando a expressão de Tuj1, Sox2 e NeuN para a iPS50.....	62

Lista de Tabelas

Tabela 1. Anticorpos primários para caracterização dos neurônios serotoninérgicos.....	45
Tabela 2. Anticorpos primários para caracterização dos organoides cerebrais	50
Tabela 3. Teste de verificação de contaminação por micoplasma	51

Lista de Abreviaturas

5-HT	Hidroxitriptamina ou serotonina
BDNF	Fator neurotrófico derivado do encéfalo
bRG	Glia radial basal
CP	Placa cortical
EB	Corpo embrioide
EEG	Eletroencefalografia
ESC	Célula-tronco embrionária
HTS	Triagem de alta produtividade
hESC	Célula-tronco embrionária humana
hiPSC	Célula-tronco pluripotente induzida humana
IGF-1	Fator de crescimento de insulina 1
IP	Célula progenitora intermediária
iPSC	Célula-tronco pluripotente induzida
ISVZ	Zona subventricular interna
IZ	Zona intermediária
MRI	Imageamento por ressonância magnética
NE	Neuroepitélio
NSC	Célula-tronco neural ou célula progenitora neural
OSVZ	Zona subventricular externa
RG	Glia radial
SFEBq	Cultura de agregação rápida de corpos embrioides, livre de soro
SSRI	Inibidor seletivo de recaptção de serotonina
SVZ	Zona subventricular
TDM	Transtorno Depressivo Maior
VZ	Zona ventricular

Índice

1. INTRODUÇÃO	18
1.1 Transtorno Depressivo Maior	19
1.2 Modelos	24
1.3 Culturas em monocamada - neurônios serotoninérgicos	28
1.4 Culturas em suspensão - organoides cerebrais	31
2. OBJETIVOS	40
2.1 Objetivo geral	40
2.2 Objetivos específicos	40
3. MATERIAL E MÉTODOS	40
3.1 Desenho experimental	40
3.2 Cultura de hiPSCs	41
3.3 Verificação de contaminação por micoplasma	42
3.4 Armazenamento das hiPSCs em Nitrogênio (N ₂) Líquido	42
3.5 Descongelamento das hiPSCs	43
3.6 Diferenciação 2D de hiPSCs em neurônios serotoninérgicos	43
3.7 Imunocitoquímica dos neurônios serotoninérgicos	44
3.8 Ensaio funcionais com neurônios serotoninérgicos	45
3.8.2 <i>Ensaio de potencial de membrana</i>	46
3.9 Produção de organoides cerebrais	46
3.10 Imunocitoquímica dos organoides cerebrais	50
4. RESULTADOS	51
4.1 Verificação de contaminação por micoplasma	51
4.2 Diferenciação 2D de hiPSCs em neurônios serotoninérgicos	51
4.3 Imunocitoquímica dos neurônios serotoninérgicos	53
4.4 Ensaio funcionais com neurônios serotoninérgicos	58
4.4.1 <i>Imageamento de cálcio</i>	58
4.4.2 <i>Ensaio de potencial de membrana</i>	58
4.5 Diferenciação de hiPSCs em organoides cerebrais	59
4.6 Imunocitoquímica dos organoides cerebrais	61

5. DISCUSSÃO	62
6. CONCLUSÕES	70
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72
8. BIOGRAFIA	79

1. INTRODUÇÃO

Muito do que se sabe atualmente sobre o desenvolvimento do sistema nervoso humano e suas patologias é proveniente de estudos com modelos animais, entretanto, há diferenças significativas entre morfologia, estruturação e fisiologia do sistema nervoso dos modelos animais em relação ao humano. Por exemplo, os seres humanos possuem o maior quociente entre o tamanho do encéfalo e o tamanho do corpo dentre todos os mamíferos (ROTH; DICKE, 2005). Em primatas, o encéfalo apresenta uma densidade neural pelo menos 7 vezes maior que a presente em encéfalos de roedores (HERCULANO-HOUZEL, 2009). Desta maneira, a complexidade presente no encéfalo humano parece estar associada a uma junção da grande densidade neural com a expansão do tamanho do encéfalo (em especial do prosencéfalo, região a partir da qual se originam áreas encefálicas responsáveis por características como desenvolvimento de raciocínios, resolução de problemas e formação de memórias, ou seja, da manifestação de uma cognição altamente especializada) (KELAVA; LANCASTER, 2016a; STILES; JERNIGAN, 2010). Entretanto, ainda há pouco conhecimento acerca de como esse desenvolvimento diferenciado das estruturas encefálicas humanas aconteceu. Neste aspecto, certamente os modelos *in vitro* possuem grande potencial de contribuição.

O desenvolvimento de modelos *in vitro* mais acurados do encéfalo humano pode levar a um melhor entendimento sobre as doenças neuropsiquiátricas. Uma das causas da baixa eficiência dos tratamentos para essas doenças, a despeito dos investimentos financeiros e de tempo implementados na área, é o problema de aplicação clínica do conhecimento obtido pela ciência básica, ou seja, entraves na pesquisa translacional (MATTHEWS et al., 2005). Um exemplo disto é o caso da esquizofrenia, que causa sintomas como pensamento desorganizado, alucinações, dificuldades na linguagem e disfunções cognitivas, ou seja, características inerentemente humanas e, portanto, de difícil avaliação em modelos animais (POWELL; MIYAKAWA, 2006). Muitas dessas características humanas estão diretamente relacionadas a questões de composição estrutural e de desenvolvimento do sistema nervoso humano. Desta forma, uma modelagem *in vitro* que permita o estudo de como ocorre esse desenvolvimento em diferentes níveis de estruturação genômica, molecular, celular, tecidual e sistêmica possui um enorme

potencial para contribuir no entendimento desta doença e na elucidação de mecanismos envolvidos na patologia das doenças neuropsiquiátricas como um todo e, por conseguinte, no desenvolvimento de tratamentos adequados para as mesmas.

No presente trabalho, focamos no estudo de apenas uma doença neuropsiquiátrica, o Transtorno Depressivo Maior (TDM), pois além de encontrar-se em uma fase muito inicial de compreensão de seus mecanismos subjacentes, esta doença ainda não possui modelos *in vitro* que recapitem adequadamente suas características e desenvolvimento (FALK et al., 2016; MARCHETTO et al., 2011). Desta maneira, o objetivo deste trabalho foi a produção de dois tipos de modelos *in vitro* para o estudo do TDM: a produção de neurônios serotoninérgicos, por meio de cultura em monocamada e a produção de organoides cerebrais, por meio de cultura em suspensão. Essas abordagens possuem potencial para contribuir na obtenção de informações relacionadas ao TDM e, conseqüentemente, no desenvolvimento de formas mais eficazes de tratamentos para esta doença.

1.1 Transtorno Depressivo Maior

O TDM é uma condição neuropsiquiátrica com herdabilidade em torno de 40% (SULLIVAN; NEALE; KENDLER, 2000), que resulta em um substancial sofrimento pessoal, incapacidade e custos sociais (BRUNONI et al., 2013). É a doença psiquiátrica de maior prevalência nos Estados Unidos, com cerca de 16 milhões de pessoas sendo afetadas por ano (National Institute of Mental Health – NIMH). Em 2015, esta doença afetou 3% da população global (216 milhões de pessoas) (VOS T, ALLEN C, ARORA M, 2016). Ao longo de suas vidas, cerca de 20% das mulheres e 15% dos homens sofrem pelo menos um episódio de depressão (KESSLER et al., 2005). Em 130 dos 188 países estudados em 2013 no *Global Burden of Disease*, o TDM localizou-se entre as 10 doenças mais incapacitantes (RICE; KELMAN; MILLER, 1991), embora dentro de alguns anos este cenário possa piorar consideravelmente, uma vez que, em 2030, a previsão é de que a doença chegue à primeira colocação (MATHERS; LONCAR, 2006). Um estudo de 2007, da Organização Mundial da Saúde (OMS), mostrou que o TDM produz maiores danos para saúde do que doenças crônicas como diabetes e artrite

(MOUSSAVI; CHATTERJI, 2007).

O TDM é caracterizado pela manifestação de episódios depressivos com duração de, no mínimo, duas semanas mas que costumam durar de 6 a 12 meses, nos quais os pacientes apresentam humor deprimido e/ou anedonia, i.e. perda de capacidade de sentir prazer, juntamente com um espectro de sintomas cognitivos e somáticos como: fadiga, perda de apetite e libido, distúrbios do sono, problemas de concentração, pensamentos de culpa, inutilidade e morte, podendo ou não haver recuperação entre os episódios (KRISHNAN; NESTLER, 2011). Avaliações de espectrometria de infravermelho próximo têm mostrado que o TDM afeta o córtex frontotemporal, que é responsável pelo controle cognitivo, tomada de decisões, resolução de problemas, acesso à memórias pré-estabelecidas, regulação de emoções, interação social e coordenação de outras áreas encefálicas (AKASHI et al., 2015). Esses resultados são corroborados por estudos utilizando imageamento por ressonância magnética (do inglês *magnetic resonance imaging* ou MRI) e eletroencefalografia (EEG), os quais mostraram alterações estruturais encefálicas como a redução da espessura do córtex e diminuição da atividade do córtex temporo-parietal direito (TALATI; WEISSMAN; HAMILTON, 2013), e por estudos *post mortem* em tecidos de pacientes, que mostraram diminuição na quantidade de células gliais no córtex pré-frontal e hipocampo e redução da substância cinzenta (RAJKOWSKA, 2003). A figura 1 indica as áreas encefálicas afetadas no TDM.

Figura 1. Regiões encefálicas envolvidas no TDM. Plano sagital de corte do encéfalo. CPF = Córtex pré-frontal. Adaptado de Drevets (2004).

No tocante a aspectos celulares e moleculares, a hipótese monoaminérgica é a mais aceita atualmente para explicar as bases neurais do TDM. Esta hipótese foi inicialmente proposta por Schildkraut, o qual considerava como participativas somente as catecolaminas, i.e. norepinefrina, epinefrina e dopamina (SCHILDKRAUT, 1965). Somente dois anos depois, Coppen passou a dar mais ênfase ao possível papel da serotonina (hidroxitriptamina ou 5-HT) (COPPEN, 1967) e, atualmente, esta configura-se como a principal molécula associada à doença. O funcionamento correto do sistema serotoninérgico é fundamental para o desenvolvimento do encéfalo humano, pois alterações indesejadas neste sistema no início da vida podem acarretar em problemas na diferenciação e maturação de vias encefálicas, afetando a sensibilidade a fatores ambientais e podendo disparar a manifestação de um episódio depressivo (Figura 2) (WHITAKER-AZMITIA, 2001). Outra evidência da associação entre TDM e o sistema serotoninérgico foi observada em estudos com modelos animais que possuem alterações em algum componente do sistema serotoninérgico, como receptores ou transportadores de serotonina e, por conta disso, mimetizam características do estado deprimido em humanos (ALBERT; BENKELFAT; DESCARRIES, 2012). Os estudos de Hesselgrave & Parsey indicaram, por meio de Tomografia de Emissão de Pósitrons (do inglês

Positron Emission Tomography ou PET Scan) que o TDM pode estar associado a um aumento nos níveis de autorreceptores de serotonina 5-HT_{1A} e também que este desbalanço é causado por uma mutação genética, ou seja, que realmente há um importante componente genético nesta doença (ALBERT, 2012; HESSELGRAVE; PARSEY, 2013).

Figura 2. Regulação de plasticidade e crescimento neurais pela monoamina 5-HT. Níveis adequados de 5-HT e fator neurotrófico derivado do encéfalo (do inglês *brain derived neurotrophic factor* ou BDNF) são necessários para o desenvolvimento neuronal normal. O 5-HT liga-se a seu receptor 5-HT₂, ativa a proteína G, aumentando a quantidade de diacilglicerol (DAG), o qual ativa a proteína quinase C, dependente de calmodulina (CAM kinase/PKC) e esta fosforila a proteína de resposta ao AMP cíclico (do inglês, *cAMP response element binding protein* ou CREB-P), aumentando os níveis de BDNF, responsável por crescimento e atividade neuronais e por uma ação antidepressiva. Alterações nos níveis normais de serotonina podem alterar esta cascata de sinalização e levar a sintomas de TDM. Adaptado de Basicamedical Key.

Os tratamentos farmacológicos mais utilizados atualmente para o TDM são os inibidores seletivos de recaptação de serotonina (do inglês *Selective Serotonin Reuptake Inhibitors* ou SSRIs), os quais inibem a recaptação do neurotransmissor pelos autorreceptores do neurônio pré-sináptico possibilitando, portanto, o aumento de sua concentração na fenda sináptica e de sua disponibilidade de ligação aos receptores do neurônio pós-sináptico (LATTIMORE et al., 2005), como demonstrado na figura 3. Contudo, apenas 50% dos pacientes são responsivos à essas drogas, sendo que a taxa de remissão da doença é de cerca de somente 30% dos casos

(TRIVEDI et al., 2006). Há também pacientes que apresentam Taquifilaxia, uma condição em que, mesmo com a utilização das dosagens adequadas de um medicamento outrora eficaz, o mesmo perde o efeito (TARGUM, 2014). E há ainda o agravante da demora de algumas semanas no aparecimento de resultados desses tratamentos. Acredita-se que isso é devido ao período de tempo necessário para os SSRIs induzirem alterações na neurogênese e na plasticidade sináptica, assim como uma grande dessensibilização dos autorreceptores 5-HT_{1A} (HARMER; COWEN; B, 2013).

Figura 3. Mecanismo de funcionamento dos SSRIs. Estes agentes bloqueiam a recaptação da 5-HT pela membrana pré-sináptica, aumentando a concentração da monoamina para o neurônio pós-sináptico. 5-HT = serotonina. Adaptado de Lattimore (2005).

Devido à complexa sintomatologia do TDM, à sua natureza multifatorial, às falhas nos tratamentos existentes atualmente, e à inacessibilidade ao encéfalo humano para manipulações experimentais por questões práticas e éticas (KELAVA; LANCASTER, 2016b), torna-se claro que somente estudos com tecidos *post mortem* ou que utilizem MRI ou EEG não são suficientes para a elucidação dos mecanismos subjacentes à doença. Tecidos *post mortem* além de serem, na maioria das vezes,

obtidos em estágios finais da doença, podem não estar bem conservados e não permitem o acompanhamento do processo de desenvolvimento do sistema nervoso (RAJKOWSKA, 2003). Estudos que utilizam MRI ou EEG fornecem informações sobre correlações entre um comportamento ou pensamento e ativação de alguma área encefálica ou diferenças em expressões de padrões eletrofisiológicos, mas não informam nada sobre a morfologia, desenvolvimento ou funcionamento da circuitaria nervosa envolvida na doença (TALATI; WEISSMAN; HAMILTON, 2013). Desta maneira, a utilização de modelos experimentais configura-se como uma ferramenta fundamental no estudo do TDM.

1.2 Modelos

Os modelos animais, ou modelos *in vivo*, têm sido bastante utilizados para a obtenção de informações sobre a estruturação, funcionalidade e desenvolvimento do sistema nervoso em humanos. Eles têm fornecido algumas bases de conhecimento acerca das doenças neuropsiquiátricas, como por exemplo o funcionamento de determinadas vias, biomarcadores, e possibilitado o estudo de fármacos (KRISHNAN; NESTLER, 2011). Esses modelos oferecem muitas vantagens, pois a análise de um organismo completo permite a identificação das interações entre diferentes tipos de tecidos e sistemas e, também, o estudo do desenvolvimento ontogenético. Entretanto, o uso de animais modelo também apresentam importantes limitações como a incapacidade de mimetizar a natureza multifatorial da maioria das doenças neuropsiquiátricas e a incapacidade de recapitulação de fenótipos exclusivamente humanos, como é o caso dos comportamentos de culpa ou tristeza, que só podem ser precisamente avaliados com o uso da linguagem (WEN et al., 2016). E mesmo em relação a fenótipos decorrentes de problemas genéticos, celulares, ou na rede neuronal, sabe-se que a estruturação e tempo de desenvolvimento em humanos é diferente da observada em modelos *in vivo*. Um exemplo disso é a morfologia dendrítica em neurônios humanos, que é mais complexa do que em camundongos, pois possui maior arborização e maiores espinhos dendríticos (DEFELIPE, 2011). Além do fato de que, dependendo do estudo, o uso de modelos animais pode ser considerado eticamente inadequado (MCGONIGLE; RUGGERI, 2014). Por conta disso, a comunidade científica passou a investir um grande esforço no desenvolvimento de modelos mais fiéis à fisiologia humana e capazes de recapitular os fenótipos das doenças neuropsiquiátricas, e

desta maneira teve início a produção dos modelos *in vitro*, os quais poderiam complementar os estudos em modelos animais e até mesmo reduzir necessidade de utilização de animais.

A primeira cultura neural *in vitro* consistiu no cultivo de neurônios de embrião de sapo (HARRISON et al., 1907). Mas, apesar desse tipo de cultura celular, denominado de cultura primária, ter contribuído para o estudo de várias características neurais ligadas à morfologia e função das células (LAPHAM; MARKESBERY, 1971), ele possui desvantagens como a dependência de aquisição repetida do tecido inicial para o cultivo, a ausência de capacidade proliferativa e a dificuldade de obtenção, dependendo do tipo de tecido de origem (HYDÉN, 1959). Essas limitações foram contornadas pelo estabelecimento da primeira linhagem de células imortalizadas (EARLE et al., 1943). Estas células, por serem provenientes de tumores, possuem capacidade de proliferarem indefinidamente. Contudo, elas possuem alterações em seu genoma, ou seja, não se encontram em condições fisiológicas normais, logo, não são o tipo celular mais indicado como um modelo acurado do que acontece *in vivo* (AUGUSTI-TOCCO; SATO, 1969; SCHUBERT et al., 1969).

Tornou-se, portanto, necessário o desenvolvimento de um tipo de modelo *in vitro* que possibilitasse a recapitulação correta das características genotípicas e fenotípicas humanas, que pudesse proliferar por tempo indeterminado, e não fosse tão difícil de ser obtido e mantido. Neste ensejo, ocorreu o surgimento de um grande marco para o estudo do desenvolvimento embrionário: a derivação da primeira linhagem de células-tronco embrionárias humanas (do inglês *human embryonic stem cells* ou hESCs) (THOMSON et al., 1998). As células-tronco possuem capacidade de auto-proliferação e podem dar origem a qualquer tipo celular de interesse, incluindo neurônios, astrócitos e oligodendrócitos, o que faz com que esse tipo celular possua grande potencial para tratamentos de inúmeras doenças neurológicas (SHROFF; DHANDA TITUS; SHROFF, 2017). No entanto, a necessidade de coletar essas células diretamente de embriões humanos gerou grandes problemas éticos (MURRY; KELLER, 2008). Porém, em 2006, esses problemas éticos foram parcialmente solucionados com o desenvolvimento da tecnologia de células-tronco pluripotentes induzidas humanas (do inglês *human induced pluripotent stem cells* ou hiPSCs). Com a utilização de 4 fatores de transcrição, conhecidos atualmente como

fatores de Yamanaka (Oct3/4, Sox2, Klf4 and c-Myc) tornou-se possível a reprogramação de praticamente qualquer célula somática humana em células com características de auto-proliferação e pluripotência iguais as das hESCs, mas sem o entrave ético. Uma das grandes vantagens desse método é o fato de que as hiPSCs podem ser produzidas a partir de células de pacientes com vários tipos de doenças, ou seja, a reprodução *in vitro* da variabilidade de genomas presentes em diferentes pacientes é atualmente possível e viável (TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006b)

Esta vigorosa busca por modelos cada vez mais adequados para o estudo da fisiologia do sistema nervoso em humanos e da patofisiologia das doenças neuropsiquiátricas é justificável ao constataremos que a ausência desses modelos agrava a lacuna existente entre a pesquisa básica e a aplicada, e que uma consequência destes problemas em estudos translacionais é a falta de eficácia no desenvolvimento de tratamentos (Food and Drug Administration – FDA). O processo de desenvolvimento de um novo fármaco é lento, laborioso e caro. Demanda um tempo médio de 10 a 15 anos e um investimento financeiro de aproximadamente 2,6 bilhões de dólares (LONG, 2017), sendo que somente 30% das novas drogas lançadas no mercado geram uma margem de lucro maior do que o custo necessário para desenvolvê-las (KAITIN, 2010) e ainda cerca de 40% das substâncias no processo de aprovação de produção e distribuição, são reprovadas pelos órgãos avaliadores (EICHLER et al., 2010). Somente 12% dos compostos investigados que chegam aos testes clínicos são aprovados pelo FDA (LONG, 2017). E, após todo esse longo processo, ainda há o risco de o fármaco causar efeitos colaterais indesejados, como foi o caso do medicamento VIOXX, um analgésico utilizado no tratamento para artrite, mas que foi retirado do mercado após comprovada associação com o aumento de risco de complicações cardíacas (SIBBALD, 2004).

Neste cenário, as hiPSCs aparecem como uma grande promessa para pesquisa translacional e consequentemente para o aperfeiçoamento do processo de desenvolvimento de tratamentos mais eficazes para as doenças neuropsiquiátricas, uma vez que já se mostraram bem sucedidas na modelagem de várias doenças *in vitro* (AVIOR; SAGI; BENVENISTY, 2016), em testes de toxicologia de fármacos (MEDINE et al., 2013) e na descoberta de mecanismos subjacentes à várias doenças (WEN et al., 2014). Um exemplo da aplicação destas células é o estudo em que se mostrou que hiPSCs reprogramadas a partir de células de pacientes com esquizofrenia possuem diferenças nas funções sinápticas quando comparadas às

hiPSCs controles (FALK et al., 2016). Outra forma de utilização do potencial das hiPSCs encontra-se em estudos de culturas de células diferenciadas a partir das hiPSCs (Figura 4), sendo que essas culturas podem ser estruturadas em monocamada (configuração em 2D) ou em suspensão (configuração em 3D) (HO; PEK; SOH, 2018). Uma forma de estudarmos as principais células afetadas no TDM, os neurônios serotoninérgicos, é por meio da diferenciação desses neurônios a partir das hiPSCs em monocamada.

Figura 4. Produção de hiPSCs e suas aplicações. São retiradas amostras de sangue ou de biópsia da pele dos pacientes, as células são reprogramadas em hiPSCs e diferenciadas no tipo neuronal de estudo. Esses neurônios podem ser utilizados para elucidação dos mecanismos subjacentes à doença, triagem de drogas, testes de toxicidade de fármacos, identificação de biomarcadores, e estratificação de pacientes. Adaptado de Soliman e colaboradores (2017).

1.3 Culturas em monocamada - neurônios serotoninérgicos

O cultivo celular em monocamada possui vantagens com relação ao cultivo em suspensão, como a facilidade de implementação e manutenção, a geração de populações celulares mais homogêneas, um menor custo e a maior facilidade de

utilização em larga escala, pois não demandam muitos equipamentos específicos (LANCASTER; KNOBLICH, 2014a).

A serotonina ou hidroxitriptamina (5-HT) é um neurotransmissor envolvido em muitos processos como regulação cardiovascular, sensibilidade à dor, alimentação, comportamentos reprodutivos, cognição, impulsividade, agressão e humor. Uma vez que o sistema serotoninérgico configura-se como um alvo de muitas classes de drogas para tratamentos psiquiátricos, acredita-se também que a serotonina está envolvida na patofisiologia de muitas doenças psiquiátricas, especialmente no TDM (VADODARIA et al., 2018). Desta maneira, o estudo do cultivo em monocamada de neurônios serotoninérgicos diferenciados a partir de hiPSCs de pacientes com TDM possui um grande potencial para contribuir com novas informações acerca da doença e de possíveis tratamentos.

O primeiro trabalho a diferenciar hiPSCs em neurônios serotoninérgicos *in vitro* foi realizado por Lu e colaboradores (LU et al., 2016). Foram utilizadas hESCs e hiPSCs derivadas de fibroblastos para a diferenciação neural. Por meio de exposição temporal das células a fatores de crescimento e moduladores de vias de sinalização, este protocolo promoveu inicialmente a produção de NSCs a partir das células-tronco e posteriormente, a diferenciação destas NSCs em neurônios serotoninérgicos maduros. As células produzidas exibiram características morfológicas e funcionais semelhantes às presentes em neurônios serotoninérgicos *in vivo*, i. e. expressão de marcadores serotoninérgicos, resposta eletrofisiológica e produção e liberação de serotonina. Além disso, responderam à administração de Escitalopram (um SSRI) e Tramadol (um SSRI e agente liberador de serotonina), com um aumento na produção de serotonina. Este resultado estabeleceu a utilidade deste modelo *in vitro* como uma ferramenta de triagem para moduladores deste neurotransmissor.

A geração de neurônios serotoninérgicos a partir de hiPSCs de pacientes com TDM ainda não foi realizada. Um estudo desse tipo, que mostrasse a possibilidade de produção dessas células e sua viabilidade, seria de extrema importância para a pesquisa translacional, uma vez que estas poderiam ser utilizadas na análise de novos fármacos e dos mecanismos por meio dos quais eles possam atuar (SOLIMAN et al., 2017)

Há diversos trabalhos que mostraram um procedimento semelhante com outras doenças neuropsiquiátricas. Foram demonstradas alterações estruturais e funcionais em neurônios derivados a partir de hiPSCs de pacientes com transtorno bipolar (MERTENS et al., 2015), autismo (MARCHETTO et al., 2017), síndrome de Rett (MARCHETTO et al., 2010) e esquizofrenia (BRENNAND et al., 2011; ROBICSEK et al., 2013). Dois desses estudos se destacam, pois, além de mostrarem a possibilidade de modelagem das doenças, eles também avaliaram a utilização de possíveis tratamentos nas células: o estudo que utilizou neurônios derivados a partir de hiPSCs de pacientes com transtorno bipolar mostrou que estas células eram hiperexcitáveis e que somente os neurônios derivados a partir de hiPSCs de pacientes que respondiam ao tratamento com lítio apresentavam diminuição da excitabilidade para níveis de controle após o tratamento com lítio *in vitro*, enquanto que os neurônios derivados de pacientes que não respondiam ao tratamento, permaneceram hiperexcitáveis após o tratamento *in vitro*, ou seja, este é um modelo possivelmente aplicável para a predição de respostas individuais aos fármacos (MERTENS et al., 2015). No estudo com neurônios derivados a partir de hiPSCs de pacientes com autismo foi mostrado que, apesar da heterogeneidade genética, havia um mecanismo em comum entre todos os pacientes estudados: uma aumentada proliferação de células progenitoras neurais, uma diferenciação neural anormal e, que os defeitos apresentados nas redes neurais podiam ser resgatados diferenciando-se esses neurônios em presença do fator de crescimento de insulina 1 (do inglês *insulin growth factor 1* ou IGF-1), uma droga que está sendo avaliada atualmente em testes clínicos para doenças do espectro autista (MARCHETTO et al., 2017).

Estes tipos de estudo mostram, portanto, evidências de que os sistemas de cultivo 2D podem ser usados com sucesso para a modelagem de alguns aspectos das doenças neuropsiquiátricas e que, portanto, esta abordagem pode também ser útil com o TDM. Contudo, esses modelos são incapazes de gerar diversidade celular, não representam estruturas de maior complexidade e não apresentam interações celulares fiéis à fisiologia *in vivo* (HO; PEK; SOH, 2018). Essas limitações podem impactar negativamente a modelagem de determinadas características das doenças neuropsiquiátricas, uma vez que elas afetam muitos tipos celulares, localizadas em diferentes regiões encefálicas (AKASHI et al., 2015; DREVETS,

2004). Neste contexto, o estudo de modelos *in vitro* 3D tem surgido como uma importante opção.

1.4 Culturas em suspensão - organoides cerebrais

A necessidade do desenvolvimento de um tipo de cultivo celular que contornasse as limitações impostas pelas culturas em monocamada impulsionou o surgimento das culturas em suspensão. Esse tipo de cultura visa a recapitulação mais acurada da morfologia, estruturação e fisiologia complexas presentes em tecidos e sistemas *in vivo*.

A diferenciação de ESCs ou iPSCs em qualquer tipo de neurônios maduros possui um estágio intermediário de produção de células progenitoras neurais (do inglês *neural stem cells* ou NSCs). As NSCs são células mais especializadas do que as ESCs ou iPSCs pois, enquanto estas são capazes de diferenciarem em qualquer tipo celular do organismo, as NSCs podem ser diferenciadas somente em neurônios ou glia (Figura 5) (YAN et al., 2013). Quando a diferenciação de NSCs para neurônios maduros ocorre *in vivo*, a estruturação 3D do organismo possibilita interações celulares que proporcionam uma organização apico-basal para as NSCs e, deste modo, elas são capazes de originar uma vasta gama de linhagens neurais estruturadas de maneira necessária para um desenvolvimento adequado. Entretanto, no cultivo *in vitro*, esta organização apico-basal é perdida, e, conseqüentemente, há falta de acurácia nesta modelagem do encéfalo em desenvolvimento (CONTI; CATTANEO, 2010). O desenvolvimento de uma estrutura denominada roseta neural, por Zhang e colaboradores, possibilitou a superação deste obstáculo e o início da transição entre os cultivos 2D e 3D (ZHANG et al., 2001). Agregados de ESCs, quando cultivados em suspensão, se diferenciam espontaneamente e originam os três folhetos germinativos (i.e. endoderme, mesoderme e ectoderme), produzindo estruturas denominadas de corpos embrioides (do inglês *embriod bodies* ou EBs). As NSCs desenvolvem-se a partir da ectoderme, que é o folheto mais externo, formando a neuroectoderme. Assim sendo, com o plaqueamento dos EBs e posterior desenvolvimento da neuroectoderme, são formadas as rosetas neurais, as quais possuem organização apico-basal semelhante ao tubo neural embrionário. Ou seja, além de possuírem capacidade de se diferenciarem em vários tipos celulares, as rosetas neurais possuem uma

estruturação mais semelhante à presente *in vivo* do que as NSCs cultivadas em monocamada (ELKABETZ et al., 2008). Em outro estudo de base importante neste cenário, desenvolveu-se um protocolo que permitia diferenciar ESCs em NSCs na ausência de soro, fatores de crescimento ou outros sinais indutivos, demonstrando a capacidade das ESCs de adquirirem identidades neurais, de forma espontânea, devido à sinalização autócrina (YING et al., 2003).

Figura 5. Possibilidades de diferenciação das NSCs. Adaptado de Sigma-Aldrich.

A combinação destes métodos de produção de rosetas neurais a partir de EBs e de diferenciação neural em ausência de soro proporcionou o desenvolvimento da cultura de agregação rápida de corpos embrioides, livre de soro (do inglês *serum-free culture of embryoid body-like with quick-aggregation* ou SFEBq) (EIRAKU et al., 2008). Foi demonstrado que os EBs quando cultivados em condições livres de soro, mas com a adição de sinais indutivos específicos, são capazes de gerar rosetas neurais, e estas podem ser posteriormente diferenciadas. Dependendo do tipo de sinal indutivo usado, era possível direcionar a diferenciação dos EBs em diferentes tipos de regiões encefálicas como adeno-hipófise (SUGA et al., 2011), retina (EIRAKU et al., 2011), prosencéfalo (KADOSHIMA et al., 2013), cerebelo (MUGURUMA et al., 2015) e hipocampo (SAKAGUCHI et al., 2015). Devido ao longo desenvolvimento inicial em suspensão, quando os EBs são plaqueados na etapa posterior, os tecidos não se achatam completamente sobre o revestimento da placa,

desta maneira, o método SFEBq é visto como um intermediário entre as culturas 2D e 3D, sendo até mesmo denominado de cultivo 2,5D (KELAVA; LANCASTER, 2016a). A primeira cultura neural inteiramente 3D foi a diferenciação de ESCs de camundongos em copos ópticos auto-organizados (EIRAKU et al., 2011). Este estudo utilizou a abordagem de SFEBq como base, juntamente com a utilização de um meio de cultura que induzia uma identidade retiniana às células. Ademais, havia outro diferencial ainda mais importante: desta vez, o cultivo inteiro fora realizado em suspensão. Foi demonstrado, portanto, pela primeira vez, que o tecido neural mantido inteiramente em suspensão poderia ser auto-organizado desenvolvendo uma estrutura tecidual complexa e madura.

Paralelamente ao desenvolvimento cada vez mais aperfeiçoado das técnicas de diferenciação neural a partir de células-tronco, estava surgindo um novo campo em biologia do desenvolvimento que até o momento era relativamente distante das neurociências: a produção de organoides. Essa tecnologia foi originada pela primeira vez a partir de células-tronco presentes no intestino adulto, as quais foram diferenciadas, *in vitro*, em tecidos 3D com características de microvilosidades das criptas intestinais (SATO et al., 2009). O destaque deste trabalho consistiu na percepção de que o uso de uma matriz extracelular gelatinosa, denominada de Matrigel, para revestir os agregados celulares, produzia um suporte estrutural que possibilitava a auto-organização apico-basal do epitélio. Lancaster e colaboradores utilizaram os conhecimentos desenvolvidos nos estudos anteriores, sobre diferenciação neural, cultura de tecidos em 3D e engenharia tecidual, unindo a tecnologia do desenvolvimento dos copos ópticos à utilização do Matrigel. Entretanto, não houve utilização de fatores de crescimento, e isto possibilitou a auto-organização do tecido, originando diferentes tipos de regiões encefálicas, incluindo córtex dorsal, prosencéfalo ventral, retina, hipocampo, plexo coróide e limite do mesencéfalo-rombencéfalo (LANCASTER; KNOBLICH, 2014a). Estas estruturas ficaram conhecidas como organoides cerebrais. Os organoides cerebrais são, portanto, agregados celulares que se desenvolvem por meio de processos auto-organizacionais intrínsecos das células, os quais ocorrem sob ação de meios de cultura e suplementos aplicados no tempo correto da diferenciação, ou seja, esse protocolo é responsável pelo estabelecimento de uma identidade neural para as células e pela recapitulação da organização estrutural 3D (Figura 6). As regiões

encefálicas independentes que são desenvolvidas nos organoides não possuem uma organização aleatória, ela segue padrões de regionalização parecido com o encontrado no encéfalo humano em desenvolvimento (Figura 7) (KELAVA; LANCASTER, 2016b). Na primeira fase da diferenciação as células se auto-organizam formando os EBs e na fase seguinte, a ectoderme começa a se diferenciar em neuroepitélio. Já na ultima etapa, após o revestimento com o Matrigel, os organoides começam a apresentar protusões de brotos neuroepiteliais, indicando o desenvolvimento e amadurecimento do neuroepitélio. Ao longo da diferenciação, estas estruturas vão aumentando de tamanho até alcançarem determinado estágio em que a difusão, para troca de gases e distribuição de nutrientes dentro dos agregados já não consegue mais ser suficientemente eficiente na cultura estacionária. Neste cenário, a introdução de agitação (seja por meio de cultivo utilizando frascos agitadores magnéticos ou placas posicionadas em agitadores orbitais) possibilita uma difusão mais eficiente e um maior crescimento dos tecidos.

Figura 6. Estabelecimento de identidade neural para as células e organização estrutural 3D. Adaptado de Lancaster e Knoblich (2014b).

Figura 7. Desenvolvimento do encéfalo humano comparado ao de organoides cerebrais. VZ = Zona ventricular, SVZ = Zona Subventricular e CP = Placa cortical. Adaptado de Kelava e Lancaster (2016b).

Os organoides cerebrais possuem desenvolvimento e estruturação semelhantes ao que acontece no primeiro trimestre do desenvolvimento do encéfalo fetal humano (Figura 8). Em humanos, o tecido encefálico tem origem em uma camada epitelial pseudoestratificada, o neuroepitélio (PRICE et al., 2011), o qual se

dobra, originando o tubo neural. O tubo neural é composto, portanto, de células neuroepiteliais (NE), polarizadas apico-basalmente em torno de um lúmen preenchido por líquido, que posteriormente origina os ventrículos. As NE originam a glia radial (do inglês *radial glia* ou RG), que são um tipo de NSCs. E a RG é capaz de originar neurônios maduros e populações intermediárias, que são as células progenitoras intermediárias (do inglês, *intermediate progenitors* ou IP) e glia radial basal (do inglês *basal radial glia* ou bRG). A RG localiza-se na zona ventricular (do inglês *ventricular zone* ou VZ) e as IP e bRG, na zona subventricular (do inglês, *subventricular zone* ou SVZ). Esta última é responsável pela proliferação e diferenciação celulares acentuadas que proporcionam a expansão encefálica humana. Em humanos, a SVZ é subdividida em zona subventricular interna (do inglês *inner subventricular zone* ou ISVZ) e externa (do inglês *outer subventricular zone* ou OSVZ), sendo esta última bem desenvolvida. Os neurônios maduros utilizam as projeções da RG para migrarem radialmente, passando por uma região com poucas células, a zona intermediária (do inglês, *intermediate zone* ou IZ), em direção à camada mais externa, a placa cortical (do inglês, *cortical plate* ou CP) (Figura 9).

Figura 8. Período de desenvolvimento encefálico humano em comparação ao de organoides. Encéfalo humano em desenvolvimento e organoides cerebrais não estão em escala. SPC = semanas pós-concepção. Adaptado de Kelava e Lancaster (2016b).

A presença de diferentes regiões encefálicas no organoide cerebral, desenvolvimento similar ao humano e sua estruturação 3D, que possibilita uma comunicação intercelular e intertecidual que recapitula de maneira mais fiel o que acontece *in vivo*, indicam o grande potencial desta estrutura para uma modelagem *in vitro* mais acurada do TDM, uma vez que esta doença afeta diferentes regiões do

encéfalo e altera a comunicação existente entre estas regiões (AKASHI et al., 2015).

Os organoides estão sendo utilizados atualmente para estudos do neurodesenvolvimento e também de algumas patologias. Lancaster e colaboradores utilizaram hiPSCs derivadas de pacientes com microcefalia causada pela mutação em heterozigose no gene CDK5RAP2 para desenvolver organoides cerebrais (LANCASTER et al., 2013). Observou-se que estas estruturas possuíam tamanho reduzido em relação aos organoides cerebrais derivados de pessoas sem a patologia. Mostrou-se que essa diminuição de tamanho estava relacionada a problemas na proliferação e expansão das progenitoras neurais presentes na OSVZ e pela diferenciação neural prematura. Outra importante descoberta deste trabalho foi que, em camundongos, o padrão de divisão das progenitoras neurais é diferente do presente em humanos, pois nesses animais não há a OSVZ (Figura 9) e, por isso, camundongos com a mesma mutação presente em humanos falham em recapitular o fenótipo da doença e não podem ser utilizados como modelos animais dela, ou seja, este estudo corrobora a ideia de que os modelos animais não devem ser encarados como a única possibilidade de modelagem para qualquer doença.

Figura 9. Neurogênese no cérebro humano comparativamente à de camundongo. VZ = zona ventricular. SVZ = Zona subventricular. ISVZ = Zona subventricular interna. OSVZ = Zona subventricular externa. IZ = Zona intermediária. CP = placa cortical. Adaptado de Kelava e Lancaster (2016a).

No tocante ao estudo de doenças infecciosas, os organoides também possuem grande importância e aplicação. Um exemplo é o caso da associação do vírus Zika com a microcefalia. Até pouco tempo atrás ainda havia muita dúvida se o desenvolvimento de microcefalia em fetos de mães infectadas pelo vírus Zika era realmente associado à ação do vírus. Como os organoides cerebrais estavam sendo utilizados para estudos do neurodesenvolvimento, eles poderiam ser um modelo muito útil para a resolução desta questão. Desta maneira, diversos trabalhos utilizaram organoides e demonstraram que o vírus Zika realmente infecta as progenitoras neurais e atenua sua proliferação, aumentando o tamanho dos lúmens ventriculares e diminuindo o tamanho do cérebro como um todo, ou seja, causando

a microcefalia (CUGOLA et al., 2016; DANG et al., 2016; GARCEZ et al., 2016; QIAN et al., 2016).

Estudos *post mortem* e que utilizam MRI em pacientes com transtornos do espectro autista indicam que pode haver um desenvolvimento encefálico anormal nestes pacientes devido a um supercrescimento inicial do encéfalo seguido de parada prematura do crescimento, especialmente na região do córtex pré-frontal, levando a desorganização da arquitetura laminar do córtex e alterações na rede cortical. Mariani e colaboradores realizaram um estudo em que os organoides derivados a partir de hiPSCs de pacientes autistas possuem diminuição na duração do ciclo celular das progenitoras, em estágios iniciais do desenvolvimento, ou seja, elas se proliferam mais rapidamente, realçando a maturação neuronal, aumentando o crescimento sináptico e a produção de interneurônios gabaérgicos inibitórios, fatores que acabam interferindo negativamente no restante do desenvolvimento. Este trabalho também constatou, por análise de transcriptoma, que a superexpressão do fator FOXP1 possivelmente era uma causa para esta desorganização e que, portanto, poderia estar envolvida no autismo (MARIANI et al., 2015). Este estudo demonstrou que os organoides podem, portanto, contribuir enormemente para a elucidação dos mecanismos envolvidos em doenças neuropsiquiátricas.

Não há, até o presente momento, registros da produção de modelos *in vitro* que utilizem hiPSCs de pacientes com TDM (FALK et al., 2016; MARCHETTO et al., 2011). Considerando que o uso de modelos *in vitro* adequados para o estudo desta doença mostra-se fundamental para a pesquisa translacional e, conseqüentemente, para o aperfeiçoamento do processo de produção de novos tratamentos, a produção destes modelos para serem utilizados em estudos futuros possui extrema importância. As hiPSCs utilizadas no presente estudo são provenientes da reprogramação feita por Pereira e colaboradores (2017), os quais são responsáveis pelo desenvolvimento da primeira coleção de hiPSCs de pacientes com TDM. Deste modo, o objetivo do presente trabalho foi a produção de modelos *in vitro* para o estudo do TDM. Mais especificamente, um modelo 2D (neurônios serotoninérgicos) e um modelo 3D (organoides cerebrais), ambos a partir de hiPSCs de pacientes com TDM.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Estabelecer modelos *in vitro* para o estudo do Transtorno Depressivo Maior.

2.2 Objetivos específicos

- Produzir neurônios serotoninérgicos por meio de diferenciação 2D a partir de hiPSCs de pacientes com Transtorno Depressivo Maior.
- Caracterizar morfolologicamente e funcionalmente os neurônios produzidos.
- Produzir organoides cerebrais a partir de hiPSCs de indivíduos controle e de pacientes com Transtorno Depressivo Maior.
- Caracterizar morfolologicamente os organoides cerebrais produzidos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Desenho experimental

Para a diferenciação 2D de hiPSCs em neurônios serotoninérgicos, foram utilizadas 5 linhagens de hiPSCs reprogramadas a partir de eritroblastos de pacientes com TDM: iPS32, 34, 64, 65 e 68 (PEREIRA, 2017). Para a diferenciação 3D de organoides cerebrais foram utilizadas 5 linhagens de hiPSCs: iPS41 (controle sem TDM) e iPS32, 33, 34 e 50 (hiPSCs reprogramadas a partir de eritroblastos de pacientes com TDM).

As hiPSCs previamente reprogramadas e congeladas foram descongeladas e expandidas, e então submetidas aos respectivos protocolos de diferenciação. Após as diferenciações, os neurônios serotoninérgicos e organoides cerebrais passaram por testes de caracterização. Para os neurônios serotoninérgicos foram realizados registros de imagens ao longo do processo de diferenciação, testes de imunocitoquímica para confirmação do fenótipo celular e, para confirmação da funcionalidade fisiológica das células, ensaio de potencial de membrana e imageamento de cálcio. Para os organoides cerebrais, foram realizados registros de imagens ao longo do processo de diferenciação e imunocitoquímica para confirmação dos fenótipos celulares presentes e avaliação da citoarquitetura dos agregados celulares. O desenho experimental encontra-se esquematizado na figura 10.

Figura 10. Desenho experimental de produção dos modelos *in vitro*.

3.2 Cultura de hiPSCs

Para a diferenciação em neurônios serotoninérgicos e organoides cerebrais, foram utilizadas hiPSCs previamente obtidas por reprogramação de eritroblastos com o Kit Amaxa® Human CD34 Cell Nucleofector® (Lonza), aparelho Nucleofector™ 2b Device (Lonza) e um set de 2 plasmídeos episomais pEB-C5 and pEB-Tg (Addgene) (CHOU et al., 2015), contendo os fatores de transcrição: Oct 4, Sox2, Klf4 e cMyc, lyn28 e SV40-T, adquirido da empresa Addgene (Addgene, Cambridge, Massachusetts, EUA) como descrito por Tofoli e colaboradores (2016). A nucleoporação seguiu as especificações do fabricante. Os eritroblastos foram obtidos a partir de amostras de sangue de doadores entre 18 e 75 anos, participantes do projeto intitulado “Escitalopram e Estimulação Transcraniana por Corrente Contínua no Transtorno Depressivo Maior: Um Ensaio Clínico

Randomizado, Duplo-cego, Placebo-controlado de Não-Inferioridade” (PEREIRA, 2017)

As hiPSCs foram cultivadas e mantidas em meio Essential 8 (E8, Life Technologies) e/ou mTeSR1 (StemCell Technologies), em placas com superfície revestida por Geltrex (Life Technologies), a 37°C e ar umidificado com 5% de CO₂. As colônias foram dissociadas quimicamente com Releasr (Science Pro), Versene (Life Technologies) ou Accutase (Life Technologies) para a propagação e expansão, antes de atingirem 100% de confluência (em torno de 5 a 7 dias).

3.3 Verificação de contaminação por micoplasma

Para garantir a qualidade das culturas, foram coletadas uma alíquota do meio de cultivo de cada linhagem de hiPSCs e utilizadas para análise de micoplasma com o Kit MycoAlert™ PLUS Mycoplasma Detection (Lonza), segundo as especificações do fabricante. A análise consiste em um teste bioquímico que explora atividades de enzimas micoplasmáticas encontradas em seis principais contaminantes da cultura. Caso haja contaminação, o micoplasma viável na amostra de sobrenadante é lisado e as enzimas reagem com o substrato presente no kit, o qual sofre catalisação convertendo ADP em ATP. O ATP é transferido para um sinal de luz através da enzima luciferase presente nos reagentes do kit. Medindo o nível de ATP na amostra antes (leitor A) e após adição do substrato (leitor B), pode-se obter uma relação indicativa da presença ou ausência de micoplasma.

3.4 Armazenamento das hiPSCs em Nitrogênio (N₂) líquido

Após a dissociação celular, as células foram ressuspensas em 6ml de uma solução composta por 90% de Soro Fetal Bovino (FBS ESq, Gibco) e 10% de Dimetilsulfóxido (DMSO HybriMax, Sigma Aldrich) e uma pequena alíquota de 10µL foi separada e corada com Trypan Blue 0,4% (Gibco), em diluição 1:1, para contagem manual na câmara de Neubauer. Cada amostra foi separada em 6 criotubos, com 1ml de solução cada.

Antes do armazenamento no nitrogênio líquido, os criotubos foram colocados em um recipiente contendo isopropanol (para o congelamento gradual de 1°C/minuto) e mantidos em freezer com temperatura -80 °C durante 24 horas. Após

este período os tubos foram transferidos para tanques de armazenamento com nitrogênio líquido.

3.5 Descongelamento das hiPSCs

Os criotubos retirados do nitrogênio líquido foram mantidos em banho-maria a 37°C durante 1 minuto e as células foram imediatamente transferidas para um tubo contendo 5 ml de meio de cultura (E8 e/ou mTeSR1). Então, as amostras foram centrifugadas para precipitação das células e descarte do meio com DMSO, e depois ressuspensas em meio de cultura com 10µM de Y-27632 (inibidor de proteína quinase associada a Rho, iROCK, Prolab) e plaqueadas.

3.6 Diferenciação 2D de hiPSCs em neurônios serotoninérgicos

O processo de geração de neurônios serotoninérgicos a partir de hiPSCs foi baseado e adaptado do protocolo de Lu e colaboradores (2016) (Figura 11). 5 linhagens de hiPSCs foram diferenciadas: iPS32, 34, 64, 65 e 68. Resumidamente, no dia -1 as hiPSCs foram dissociadas com Versene 1x (Thermo Scientific), plaqueadas em uma concentração de aproximadamente 2×10^4 células/cm² em uma placa de 12 wells com coating de Geltrex e cultivadas com meio E8 e 10µM de iROCK. No dia seguinte (dia 0), em que as células atingiram uma confluência de aproximadamente 20% do poço, iniciou-se a diferenciação: foi adicionado o meio SDC, que consistia em 47% de DMEM/F12 (Gibco), 47% de Neurobasal (Gibco), 1% de Glutamax (Gibco), 1% de MEM NEAA (Gibco), 1% N2 suplemento (Gibco), 2% suplemento B27 (Gibco), 1% Antibiótico-Antimicótico (Gibco), 2 µM SB431245 (R&D Systems), 2 µM DMH1 (R&D Systems) e 3 µM CHIR99021 (R&D Systems). Após 7 dias de diferenciação, as células foram passadas mecanicamente, na proporção de 1:3 e cultivadas por 7 dias com o meio SDC, suplementado com 25µM SAG (Tocris Bioscience). No dia 14, as células foram passadas utilizando-se o mesmo procedimento anterior e cultivadas por mais 7 dias, em meio SDC suplementado com 25µM SAG e 10 ng/ml de FGF4 (R&D Systems). No dia 21, as células foram passadas novamente a uma taxa de 1:3 e cultivadas com meio NDM, que consiste em 95% de Neurobasal, 1% de MEM-NEAA, 1% de Antibiótico-Antimicótico, 1% de

suplemento de N2, 2% de suplemento de B27, 10 ng/ml BDNF (R&D Systems), 10 ng/ml de GDNF (R&D Systems), 200 μ M Ácido Ascórbico (Sigma Aldrich), 1 ng/ml TGF β 3 (Sistemas R & D), 2,5 μ M DAPT (R&D Systems), 10 ng/ml de IGF-I (R&D Systems) e 1 mg/ml de Laminina (Gibco). Algumas placas foram cultivadas até o dia 28, e as células fixadas e tratadas para imunocitoquímica e as outras placas foram cultivadas até o dia 42 para serem realizados os ensaios funcionais.

Figura 11. Protocolo de diferenciação serotoninérgica. Adaptado de (LU et al., 2016).

3.7 Imunocitoquímica dos neurônios serotoninérgicos

Após 28 dias de diferenciação, as células foram fixadas em paraformaldeído a 4% (PFA) durante 20min em temperatura ambiente, permeabilizadas com Triton X-100 0,1% diluído em PBS, e bloqueadas com BSA 2% diluído em PBS. As células foram incubadas em anticorpo primário a 4°C por 24 horas. Os anticorpos primários utilizados foram: 5-hidroxitriptamina (5-HT, diluição 1:250; Abcam), 5-HT Transporter (T5-HT, diluição 1:100; Abcam), Nestin (diluição 1:200; Abcam) e β -tubulina classe III (Tuj1, diluição 1:400; Abcam). Os anticorpos usados encontram-se descritos na tabela 1. Os anticorpos secundários foram adicionados às células, longe da luz direta, por 2 horas à temperatura ambiente. Os anticorpos secundários utilizados foram AlexaFluor 488 (diluição 1:200; Thermo Fisher Scientific) e AlexaFluor 594 (diluição 1:200; Thermo Fisher Scientific) e 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, diluição 1:10; Thermo Fisher). As imagens foram analisadas no microscópio de fluorescência Evos FL Cell Imaging System (Thermo Fisher Scientific).

Tabela 1. Anticorpos primários para caracterização dos neurônios serotoninérgicos

Anticorpo primário	Função
5-HT (Serotonina)	Principal neurotransmissor liberado pelos neurônios serotoninérgicos
T5-HT (Transportador de 5-HT)	Estruturas presentes nos neurônios pré-sinápticos responsáveis pela recaptação de 5-HT após a transmissão do sinal nervoso
Nestina	Marcador neural precoce; proteína de filamentos intermediários expressa pelas células progenitoras neurais
β -Tubulina III (Tuj1)	Proteína do citoesqueleto, neurônio-específica

3.8 Ensaios funcionais com neurônios serotoninérgicos

As oscilações de concentração de cálcio intracelular, chamadas de transientes de cálcio intracelular ($\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$) acontecem conforme abertura de canais de cálcio (BERRIDGE; LIPP; BOOTMAN, 2000). Ou seja, se os neurônios respondem ao estímulo fornecido, os canais de cálcio abrem-se, o cálcio entra nestas células, liga-se ao fluoróforo que foi incorporado ao interior das células no início do teste e a medida de fluorescência aumenta, indicando, que as células são fisiologicamente funcionais (GLASER et al., 2015). Para avaliarmos se as células diferenciadas apresentavam respostas fisiológicas, realizamos dois tipos de testes para medir o ($\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$), o ensaio de imageamento de cálcio e as medidas de alteração no potencial de membrana.

3.8.1 Imageamento de cálcio

Após 42 dias de diferenciação, as células foram carregadas com tampão Fluo3AM (Invitrogen®) como descrito anteriormente (GLASER et al., 2015). O imageamento de cálcio foi realizado em um microscópio de fluorescência invertida ECLIPSE-TiS (Nikon®, Melville, NY) equipado com uma câmera CCD de alta

resolução de 14 bits CoolSNAP HQ2 (Photometrics®, Tucson, AZ) a 2 quadros/s por pelo menos 3min. Após 20s de imagem celular (fluorescência basal: F0), o NMDA a 40μM de concentração final foi aplicado e houve o registro das oscilações na concentração de cálcio intracelular (transientes de cálcio intracelular ou $\Delta [Ca^{2+}]_i$) através de mudanças na intensidade de fluorescência emitida (F). Após o declínio da $[Ca^{2+}]_i$, ionomicina 10 (μM) e, posteriormente, EGTA (30 mM) foram aplicados, como controle, para medir a intensidade máxima (Fmax) e mínima de fluorescência (Fmin), respectivamente. Regiões de interesse (ROI) para pelo menos 20 neurônios foram extraídas das imagens e analisadas manualmente. Células com (F-F0) / F0 maior que 0,5 foram consideradas como responsivas ao estímulo. O equipamento foi calibrado usando-se o kit de tampão de calibração de cálcio Molecular Probes.

3.8.2 Ensaio de potencial de membrana

Após 42 dias de diferenciação, os neurônios foram corados com o kit vermelho *FLIPR Membrane potential assay* (Bulk) (Molecular Devices®, Sunny Valley, CA), seguindo as instruções do fabricante. Os transientes de concentração de cálcio intracelular livre ($[Ca^{2+}]_i$) foram capturados com um leitor de placas FlexStation 3 (Molecular Devices®, Sunny Valley, CA), como descrito anteriormente (Glaser et al., 2015). No dia do ensaio, as células foram incubadas por 1h a 37 °C com a solução indicadora de cálcio. As alterações na fluorescência emitida, da intensidade mínima à máxima ($\Delta F = F - F_0$), normalizadas pelo estado de referência, indicaram alterações em $[Ca^{2+}]_i$. KCl (60mM) foi utilizado como estímulo despolarizante, abrindo os canais dependentes de voltagem e levando ao rápido influxo celular de cálcio e, conseqüentemente, a um aumento da medida de fluorescência. Uma solução salina tamponada com fosfato (PBS) foi aplicada como controle.

3.9 Produção de organoides cerebrais

A diferenciação em organoides cerebrais foi baseada em dois protocolos distintos: o primeiro, previamente descrito por Sartore e colaboradores (SARTORE et al., 2017) e o segundo previamente descrito por Lancaster e colaboradores (LANCASTER; KNOBLICH, 2014a).

Protocolo de Sartore e colaboradores (2017) (Figura 12): as hiPSCs, que se encontravam em cultura de monocamada em placas aderentes de 6 wells com meio mTeSR1, ao atingirem confluência máxima de 70%, foram dissociadas em single cells, com o uso de Accutase (Stem Pro) ou Versene (Gibco). 250.000 céls/ml foram inoculadas em um frasco agitador magnético (Techne) com volume final de 50ml de mTeSR1 com 10 μ M de iROCK e agitação constante de 40 rpm. Após 24 horas, o meio foi trocado por um meio indutor de corpos embrioides (Embrioid Bodies, EBs), que consistia em meio base de DMEM/F12 (Life Technologies), 20% de KSR (Life Technologies), 3% de FBS ESq (Life Technologies), 1% de GlutaMAX (Life Technologies), 1% de MEM NEAA (Life Technologies), 1% de Hepes (Life Technologies), 7 μ l/L de β -Mercaptoetanol (Life Technologies). No primeiro dia de troca, o meio EB foi suplementado com 4ng/ml de bFGF (R&D Systems). Então, o meio EB passou a ser trocado a cada dois dias, dessa vez sem o bFGF. No dia 6, os EBs foram alimentados por mais seis dias com meio de indução neural, para início de formação da neuroectoderme, que consistia em meio base de DMEM/F12, 1% de GlutaMAX, 1% de MEM NEAA, 1% de Suplemento N2, 1% de Hepes e 1 μ g/ml (concentração final) de Heparina (Sigma). Esse meio foi trocado a cada dois dias. No dia 12, os agregados celulares foram transferidos para placas preparadas com Matrigel (BD) por 1 hora à 37°C e 5% de CO₂ (Figura 13) e, após a polimerização, os agregados celulares retornaram para os frascos agitadores com meio de diferenciação neural sem vitamina A, que consistia em meio base de DMEM/F12 + Neurobasal (Life Technologies) na proporção 1:1, 1% de GlutaMAX, 0,5% de MEM NEAA, 0,5% de Suplemento N2, 1% de Suplemento B27 sem vitamina A (Life Technologies), 1% de Hepes, 3,5 μ l/L de β -Mercaptoetanol, 100U/ml de Penicilina/Estreptomicina (Life Technologies) e 3,5mg/ml de Insulina (Sigma). Este meio foi trocado a cada dois dias. Após quatro dias, os organoides passaram a receber o meio de diferenciação neural com vitamina A, que possuía formulação idêntica ao meio anteriormente descrito, com exceção do suplemento B27, que neste caso possuía vitamina A, em forma de ácido retinóico (AR) (Life Technologies). O meio foi trocado a cada semana até os organoides completarem 45 dias de diferenciação.

Figura 12. Protocolo de diferenciação de iPSCs em organoides cerebrais. Adaptado de Sartore (2017).

Figura 13. Revestimento dos organoides cerebrais com Matrigel. Cada gota de matrigel possui um organoide inserido.

Protocolo de Lancaster e colaboradores (2014) (Figura 14): as hiPSCs, que se encontravam em cultura de monocamada em placas aderentes de 6 wells com meio mTeSR1, ao atingirem confluência máxima de 70%, foram dissociadas em single cells, com o uso de Accutase ou Versene e plaqueadas em placas de 96 wells low attachment (Corning) na concentração de 9×10^3 células em 150 μ l de meio EB por well com adição de 4ng/ml de bFGF e de 5uM de iROCK, para a produção de EBs, e ficaram nessa condição de 4 a 6 dias. O meio foi trocado nos dias 3 e 5. No dia 6, as células passaram a ser cultivadas em placas de 24 wells low attachment com 500 μ l de meio de indução neural. Este meio foi mantido por volta de 4 a 6 dias, sendo trocado a cada 2 dias e, após essa fase, os agregados celulares foram transferidos para placas preparadas com Matrigel por 1 hora à 37°C e 5% de CO₂ (Figura 13). Após a polimerização, os agregados celulares foram transportados para discos de 60mm (Corning) com meio de diferenciação sem vitamina A que foi

trocado a cada dois dias. Após quatro dias, os organoides passaram a receber o meio de diferenciação neural com vitamina A (AR) e os discos foram colocados em um agitador orbital (em substituição ao frasco agitador magnético) com uma agitação constante de 85rpm. O meio foi trocado a cada semana até os organoides completarem 45 dias de diferenciação.

Figura 14. Protocolo de diferenciação de iPSCs em organoides cerebrais. Adaptado de Lancaster e colaboradores (2013)

A cada etapa da diferenciação, os organoides cerebrais foram transferidos para placas de Petri não aderentes e fotografados com o microscópio EVOS XL (Thermo Fisher Scientific), para verificar-se se a morfologia dos agregados celulares estava correta e se eles estavam aumentando de tamanho. Na etapa de formação de EBs, os mesmos deveriam apresentar bordas suaves e contínuas, com clara delimitação. Na etapa de indução neural, os agregados celulares deveriam apresentar bordas suaves e com aspecto translúcido, característica que indica a formação da neuroectoderme. Já na etapa de diferenciação neural, após o revestimento com Matrigel (o qual era responsável por fornecer um eixo apico-basal às células e fatores de crescimento importantes na diferenciação e amadurecimento dos neurônios), os agregados deveriam começar a apresentar brotos, indicando que o neuroepitélio começou a ser desenvolvido. Exemplos da morfologia correta em cada etapa encontram-se na figura 15.

Figura 15. Exemplos de morfologia correta em cada etapa de diferenciação dos organoides cerebrais. EB no dia 5 com superfície suave, indicando um tecido saudável (a). Organóide em meio de indução neural, no dia 10, mostrando uma neuroectoderme opticamente translúcida (seta) (b). Organóide no dia 28 do protocolo, revelando grandes tecidos neurais (setas) que se expandiram bastante quando incorporados no Matrigel (c). Escala 200µm. Adaptado de Lancaster e Knoblich (2014a).

3.10 Imunocitoquímica dos organoides cerebrais

Os organoides cerebrais foram fixados em paraformaldeído 4% por 1 hora em temperatura ambiente, sequencialmente incubados em solução de sacarose (10, 20 e 30%) preparada em PBS, colocados em Tissue Tek O.C.T., congelados em gelo seco e armazenados a -80°C. Após esse procedimento, foram cortados em um criostato em secções de 20µm de espessura. Os anticorpos primários utilizados foram: Sox2 (diluição 1:200, Cell Signalling), β -tubulina classe III (Tuj1, diluição 1:400; Abcam) e NeuN (diluição 1:200, Millipore). Os anticorpos usados encontram-se descritos na tabela 2. Os anticorpos secundários utilizados foram AlexaFluor 488 (diluição 1:200, Thermo Fisher Scientific) e AlexaFluor 594 (diluição 1:200, Thermo Fisher Scientific) e 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, diluição 1:10; Thermo Fisher). As imagens foram analisadas no microscópio de fluorescência Evos FL Cell Imaging System (Thermo Fisher Scientific).

Tabela 2. Anticorpos primários para caracterização dos organoides cerebrais

Anticorpo primário	Função
Sox 2	Fator de transcrição presente nas células progenitoras neurais
β -Tubulina III (Tuj1)	Proteína do citoesqueleto, neurônio-específica
Neuronal Nuclei (NeuN)	Marcador de neurônio maduro

4. RESULTADOS

4.1 Verificação de contaminação por micoplasma

A razão entre a quantidade de ATP dentro da amostra antes (medida A) e após da adição do substrato (medida B) se mostrou inferiores ao controle positivo (amostra com presença de contaminante) em todas as linhagens. Desta maneira, o teste realizado mostrou resultados negativos quanto à presença do contaminante para as 5 linhagens de hiPSCs (Tabela 3).

Tabela 3. Teste de verificação de contaminação por micoplasma

Linhagens	Medida A	Medida B	Razão (A/B)
iPS32	15,269	5479	0,358
iPS34	17,065	4,757	0,278
iPS64	13,491	4,274	0,316
iPS65	26,713	7,528	0,281
iPS68	147	52	0,353
Controle +	2,298	2.404,791	2.402,493
Controle -	2,945	363	0,123

4.2 Diferenciação 2D de hiPSCs em neurônios serotoninérgicos

As 5 linhagens hiPSCs chegaram ao fim do processo de diferenciação. O processo foi monitorado e registrado através do microscópio invertido Evos XL (Thermo Fisher Scientific) nos dias 0, 15 e 39 (Figura 16). Nas três primeiras semanas, houve desenvolvimento das NSCs, sendo possível observar a formação de extensões neurais e agregados celulares na terceira semana de diferenciação. Estas extensões neurais, denominadas de neuritos, foram progressivamente aumentando em quantidade e espessura ao longo da quarta semana de cultivo, juntamente com o amadurecimento dos neurônios.

Figura 16. Progresso da diferenciação serotoninérgica das iPS 32, 34, 64, 65 e 68 nos dias 0, 15 e 39. Escala = 400µm (dias 0 e 15) e 200µm (dia 39).

4.3 Imunocitoquímica dos neurônios serotoninérgicos

A imunocitoquímica foi realizada após 28 dias de diferenciação com os anticorpos contra as seguintes proteínas: 5-hidroxitriptamina (5-HT), também conhecida como serotonina, que é o principal neurotransmissor liberado pelos neurônios serotoninérgicos (Figura 17); Transportador de 5-HT (T5-HT), estruturas presentes em neurônios pré-sinápticos, responsáveis pela recaptação de 5-HT após a transmissão do sinal neural (Figura 18); Nestina, marcador de diferentes tipos de células neurais, envolvido no desenvolvimento de neurônios (Figura 19); e β -tubulina de classe III (Tuj1), proteína do citoesqueleto, neurônio-específica (Figura 20). Todos esses marcadores foram expressos por todas as linhagens diferenciadas, demonstrando que as células possuem fenótipo de neurônio maduro e que estes neurônios produzem e são capazes de realizar a recaptação de serotonina, ou seja, que as células produzidas a partir das hiPSCs dos pacientes com TDM são neurônios serotoninérgicos, como esperado.

Figura 17. Imunocitoquímica demonstrando a expressão de 5-HT para iPS32, 34, 64, 65 e 68. Escala = 400μm. DAPI = 4',6-diamidino-2-phenylindole.

Figura 18. Imunocitoquímica demonstrando a expressão de T5-HT para iPS32, 34, 64, 65 e 68. Escala = 400µm. DAPI = 4',6-diamidino-2-phenylindole.

Figura 19. Imunocitoquímica demonstrando a expressão de Nestina para iPS32, 34, 64, 65 e 68. Escala = 400µm. DAPI = 4',6-diamidino-2-phenylindole.

Figura 20. Imunocitoquímica demonstrando a expressão de Tuj1 para iPS32, 34, 64, 65 e 68. Escala = 400μm. DAPI = 4',6-diamidino-2-phenylindole.

4.4 Ensaios funcionais com neurônios serotoninérgicos

As células diferenciadas a partir das 5 linhagens de hiPSCs foram submetidas aos ensaios funcionais com 42 dias de cultivo e apresentaram respostas aos estímulos de NMDA e KCl implementados, indicando que os neurônios são fisiologicamente funcionais.

4.4.1 Imageamento de cálcio

As respostas produzidas pelas iPS 32, 34, 64 e 65 indicam medidas de fluorescência $(F-F_0)/F_0$ maiores do que 0,5, atingindo portanto, magnitude suficiente de $\Delta[Ca^{2+}]_i$ no ensaio de imageamento de cálcio. A única linhagem que não atingiu esta magnitude foi a iPS68 (Figura 21), embora a curva tenha mostrado uma tendência de resposta ao estímulo.

Figura 21. Atividade neuronal medida por influxo de cálcio induzido por NMDA. Medição de alteração de fluorescência em decorrência de influxo de cálcio nas 5 hiPSCs com 40 μ M de NMDA como estímulo.

4.4.2 Ensaio de potencial de membrana

No ensaio de potencial de membrana, todas as linhagens expressaram resposta ao estímulo de KCl, indicada pelo aumento da medida de fluorescência (Figura 22). As respostas de alteração de potencial de membrana obtidas para as 5 linhagens são características de células excitáveis, como os neurônios.

Potencial de membrana

Figura 22. Atividade neuronal medida por ensaios de potencial de membrana. Medição de alteração do potencial de membrana nas 5 hiPSCs com 60mM de KCl como estímulo.

4.5 Diferenciação de hiPSCs em organoides cerebrais

Das 5 linhagens de hiPSCs usadas para a produção de organoides cerebrais, 4 não conseguiram ser efetivamente diferenciadas pois as estruturas começaram a se desfazer no decorrer do processo (iPS32, 33, 34 e 41) (Figura 23) e somente uma se manteve íntegra até o final da etapa de diferenciação neural após ser colocada no agitador orbital (iPS50) (Figura 24). Entretanto ela foi cultivada somente até o dia 41, pois os organoides começaram a apresentar indícios de diminuição de tamanho, e assim decidimos não esperar até o dia 45 para fixá-los. Na primeira fase da diferenciação (dias 0-6), os EBs apresentaram bordas contínuas e bem delimitadas. Na etapa de neuroindução (dias 6-11), os agregados celulares desenvolveram uma superfície externa translúcida, indicando surgimento do neuroepitélio. Já na última fase (dia 11 em diante), os organoides começaram a apresentar protusões de brotos neuroepiteliais, indicando o desenvolvimento e amadurecimento do neuroepitélio.

Figura 23. Linhagens de hiPSCs que não geraram organoides. IPS32 com 23 dias de cultivo (a). IPS33 com 6 dias de cultivo (b). IPS34 com 15 dias de cultivo (c) e iPS 41 com 15 dias de cultivo (d). Escala 400µm.

Figura 24. Progressão do desenvolvimento dos organoides da linhagem iPS50. 6 dias de cultivo (a); 11 dias de cultivo (b); 15 dias de cultivo (c); 37 dias de cultivo (d). Escala 400µm (a, b e c) e 800µm (d).

4.6 Imunocitoquímica dos organoides cerebrais

A imunocitoquímica foi realizada após 41 dias de diferenciação com os anticorpos contra as seguintes proteínas: Sox2, um fator de transcrição presente nas células progenitoras neurais e, conseqüentemente, indicativo da zona ventricular; β -tubulina de classe III (Tuj1) uma proteína do citoesqueleto, neurônio-específica; e neuronal nuclei (NeuN), um marcador de neurônios maduros. Estes dois últimos marcadores indicam a localidade da placa cortical, região encefálica onde estão localizados os neurônios diferenciados (Figura 25). O Sox2 foi expresso nas estruturas mais internas dos organoides, ao redor dos lúmens, que recapitulam a estrutura dos ventrículos encefálicos, indicando o fenótipo celular de progenitoras neurais e a presença da zona ventricular e o Tuj1 foi expresso em áreas mais externas dos organoides, indicando o fenótipo de neurônios maduros e a presença da placa cortical. O Marcador NeuN não foi expresso pelas células, demonstrando que os neurônios diferenciados ainda estão em processo de amadurecimento, uma vez que ainda não chegaram no estágio necessário para expressar esse marcador.

Figura 25. Imunocitoquímica demonstrando a expressão de Tuj1 (b), (f) e (n), Sox2 (c) e (j) e NeuN (g) para a iPS50. Escala = 200µm (a, b, c, d, e, f, g, h) e 100µm (i, j, k, l, m, n, o). DAPI = 4',6-diamidino-2-phenylindole.

5. DISCUSSÃO

Grande parte das dificuldades enfrentadas no desenvolvimento de tratamentos adequados para doenças neuropsiquiátricas acontece devido a falhas em pesquisa translacional, ou seja, em modos mais eficientes de aplicação clínica do conhecimento obtido pela ciência básica (MATTHEWS et al., 2005). A ausência de modelos que recapitem de forma acurada os fenótipos e as características patofisiológicas da doença agravam extremamente esta lacuna. Visando minimizá-la, a área de pesquisa em desenvolvimento de modelos *in vitro* possui enorme

destaque, sendo inegável a importância do aperfeiçoamento dos já existentes e do surgimento de novos modelos (FALK et al., 2016; MARCHETTO et al., 2011). O Transtorno Depressivo Maior é uma doença de natureza multifatorial, com herdabilidade de cerca de 40% (SULLIVAN; NEALE; KENDLER, 2000), e previsão de se tornar a doença neuropsiquiátrica mais incapacitante do mundo em 2030 (MATHERS; LONCAR, 2006). Atualmente a maioria dos estudos relacionados a essa doença utilizam tecidos encefálicos de pacientes coletados *post mortem*, estudos de imageamento por ressonância magnética e/ou eletroencefalografia, ou ainda modelos animais. Entretanto esses estudos apresentam grandes limitações, estudos com tecidos *post mortem* não permitem o acompanhamento do desenvolvimento da doença e podem ser prejudicados devido a dificuldade de conservação da amostra (RAJKOWSKA, 2003), estudos de MRI e EEG só permitem a observação de correlações entre um comportamento ou pensamento e a ativação de alguma área encefálica ou diferenças nos padrões eletrofisiológicos, mas não fornecem informações sobre a morfologia, desenvolvimento ou funcionamento da circuitaria nervosa envolvida na doença (TALATI; WEISSMAN; HAMILTON, 2013) e modelos animais possuem diferenças estruturais, morfológicas e funcionais em relação à espécie humana, sendo incapazes de recapitular fenótipos inerentemente humanos, como por exemplo comportamentos de tristeza ou culpa, e em mimetizar com precisão a natureza multifatorial do TDM (DEFELIPE, 2011; WEN et al., 2016). Desta maneira, o desenvolvimento de modelos que apresentem características fenotípicas mais similares às observadas em indivíduos acometidos pela TDM, que possibilitem a recapitulação da diversidade genética da população e que sejam de fácil produção e manutenção, torna-se fundamental para o entendimento desta doença. Neste cenário, a tecnologia de produção de células-tronco pluripotentes induzidas humanas surgiu como uma grande promessa (TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006a), uma vez que possibilita a produção de tipos celulares de interesse para o estudo da doença, como neurônios e glia, a partir de células somáticas reprogramadas dos pacientes. Entretanto, até o momento, não há registros da produção de modelos *in vitro* a partir hiPSCs de pacientes com TDM (FALK et al., 2016; MARCHETTO et al., 2011), desta maneira, visando suprir esta lacuna, o presente estudo teve por objetivo a produção e caracterização de dois tipos de modelos *in vitro* a partir de hiPSCs de pacientes com TDM: neurônios

serotoninérgicos, uma cultura celular em monocamada, e organoides cerebrais, uma cultura celular em suspensão.

A produção dos neurônios serotoninérgicos foi realizada a partir de 5 linhagens de hiPSCs de pacientes com TDM: iPS32, iPS34, iPS64, iPS65 e iPS68. As 5 linhagens foram cultivadas por 42 dias em meio de cultura próprio para desenvolvimento neural com aplicação de diferentes fatores de crescimento e moduladores de vias de sinalização responsáveis por induzir primeiramente a formação de progenitoras neurais a partir das hiPSCs, e posteriormente o progressivo amadurecimento destas NSCs em neurônios serotoninérgicos. Nas três primeiras semanas, as células demonstraram intensa proliferação, com rápido aumento de tamanho das colônias, sendo que, por volta do quarto dia pós-passagem de cada semana, as colônias passavam a cobrir praticamente toda a superfície da placa de cultura. A partir do dia 15, observamos a formação de extensões neurais e agregados celulares, indicando o início do estabelecimento da comunicação neural e amadurecimento das NSCs. A quantidade destes prolongamentos neurais aumentou progressivamente ao longo da quarta semana de cultivo, juntamente com espessamento dos feixes de fibras entre os agregados celulares, indicando um possível estabelecimento de comunicação sináptica entre as células (DE-MIGUEL, 2000; REESE; DRAPEAU, 1998). A partir da quinta semana, a quantidade destes prolongamentos manteve-se praticamente constante. Apesar de os cultivos de todas as linhagens terem sido iniciados ao mesmo tempo e com a mesma quantidade de células (2×10^4 cél/cm²), houve diferenças morfológicas entre as colônias de cada linhagem. As linhagens iPS32, iPS34 e iPS64 apresentaram uma proliferação relativamente mais intensa do que as outras linhagens, uma vez que as colônias cresceram comparativamente mais rápido. No cultivo da linhagem iPS68, houve formação de agregados mais isolados e mais consistentes, com presença de feixes de prolongamentos neurais mais espessos do que nas outras linhagens.

A caracterização imunocitoquímica das células diferenciadas, realizada após 28 dias de cultivo, utilizando os marcadores 5-hidroxitriptamina (5-HT), Transportador de 5-HT (T5-HT), Nestina e β -tubulina de classe III (Tuj1) produziu resultados positivos. Apesar de haver diferença na intensidade de expressão dos marcadores entre as 5 linhagens, todos os marcadores foram expressos pelos neurônios diferenciados de todas as linhagens. A expressão de Nestina e Tuj1

indicaram presença de fenótipo de neurônios maduros, a expressão de 5-HT demonstrou que estes neurônios são capazes de produzir a serotonina e a expressão de T5-HT indicou que as células produziram os transportadores de serotonina, estruturas fundamentais no processo de recaptação do neurotransmissor da fenda sináptica em direção ao neurônio pré-sináptico, após a sinalização celular. Ficou demonstrado, deste modo, que as células diferenciadas possuem o fenótipo esperado de neurônios serotoninérgicos. As diferenças de intensidade de expressão podem ser devidas à diversidade genética dos pacientes.

As células diferenciadas também foram avaliadas quanto à sua funcionalidade fisiológica, uma vez que neurônios são células eletricamente excitáveis (KANDEL et al., 2013). Com objetivo de avaliar a funcionalidade celular, realizamos os ensaios de imageamento de cálcio e as medidas de alteração no potencial de membrana. No ensaio de imageamento de cálcio, o estímulo dado foi o N-metil D-aspartato (NMDA), um agonista do glutamato, que se liga os receptores de glutamato e provoca abertura dos canais de cálcio, permitindo seu influxo (KANDEL et al., 2013). Para serem consideradas responsivas ao estímulo e, portanto, fisiologicamente funcionais, as células precisavam apresentar a medida de fluorescência $(F-F_0)/F_0$ maior do que 0,5. As iPS 32, 34 64 e 65 atingiram este valor, portanto atingiram magnitude suficiente de $\Delta [Ca^{2+}]_i$ neste ensaio. A única linhagem que não atingiu esta magnitude foi a iPS68, embora o padrão da curva mostre uma tendência de resposta ao estímulo. Como pode ser visto na figura 16, a iPS68 possuía uma menor quantidade de células e elas estão distribuídas em forma de grumos espaçados na placa. É possível que este menor número de células tenha influenciado no resultado da medida de fluorescência (GLASER et al., 2015). O outro ensaio de funcionalidade realizado mediu as alterações no potencial de membrana das células. O estímulo fornecido neste caso foi o KCl, o qual desencadeia a despolarização da membrana, principalmente através de canais de K^+ dependentes de voltagem, permitindo o influxo de cálcio. Esse padrão de resposta é encontrado somente em células excitáveis, como cardiomiócitos e neurônios (KANDEL et al., 2013). Todas as linhagens mostraram resposta a este estímulo, indicando que as células possuem resposta fisiológica de padrão neuronal.

As diferenças morfológicas encontradas entre as linhagens ao longo do desenvolvimento da diferenciação serotoninérgica, as diferenças de intensidade na expressão dos marcadores do fenótipo serotoninérgico e de padrões de resposta

obtidos nos testes funcionais são indicadores da variabilidade presente entre as linhagens, demonstrando que esse tipo de modelo é capaz de recapitular *in vitro* a diversidade genética dos pacientes, sendo portanto um modelo interessante para futuros testes de toxicidade e eficiência de fármacos de uma forma personalizada, ou seja, possibilitando a avaliação de qual o melhor medicamento para cada paciente (VADODARIA et al., 2018). Neste contexto, um próximo passo seria a avaliação dos efeitos que algum SSRIs, como o Escitalopram ou Tramadol, exerce sobre as diferentes linhagens de neurônios serotoninérgicos produzidas neste estudo, similar ao realizado por Lu e colaboradores (2016).

A produção de organoides cerebrais feita por meio de cultivo em suspensão, foi realizada a partir de 4 linhagens de hiPSCs de pacientes com Transtorno Depressivo Maior (iPS32, iPS33, iPS34 e iPS50) e uma linhagem de hiPSC controle, sem a doença (iPS41). As 5 linhagens foram cultivadas por 41 dias em meio de cultura próprio para desenvolvimento neural com aplicação de diferentes suplementos e agitação nos tempos corretos da diferenciação. Foi importante observar a morfologia dos agregados celulares diariamente, com objetivo de evitar a perda do tempo correto de mudança de tipo de meio de cultura, pois se algum meio de cultura é disponibilizado no tempo errado, pode prejudicar a diferenciação (LANCASTER; KNOBLICH, 2014a). Das 5 linhagens diferenciadas, somente 1 manteve a estrutura de agregados celulares íntegra até o final do processo, enquanto que as outras 4 não obtiveram sucesso na diferenciação, uma vez que os agregados celulares morreram no decorrer do processo. A iPS 32 aparentemente estava diferenciando-se adequadamente, entretanto, após ser colocada sob ação do agitador orbital, as células começaram a se soltar dos agregados e eles foram diminuindo de tamanho. A iPS 33 teve o desenvolvimento interrompido na primeira fase. Os EBs formados não possuíam bordas regulares e contínuas e apresentavam muitas células soltas. Apesar de possuírem formação adequada dos EBs, as iPS 34 e 41 apresentaram início de diminuição de tamanho na fase de neuroindução, e mesmo após o revestimento com Matrigel, essa diminuição de tamanho das estruturas prosseguiu e os agregados ficaram muito diminutos. A única linhagem que sobreviveu ao processo de diferenciação foi a iPS50. Na primeira fase da diferenciação (dias 0-6), os EBs apresentaram bordas contínuas e bem delimitadas. Na etapa de neuroindução (dias 6-11), os agregados celulares possuíam superfície externa translúcida, indicando surgimento do neuroepitélio. E na última fase (do dia

11 em diante), os organoides começam a apresentar protusões de brotos neuroepiteliais, indicando o desenvolvimento e amadurecimento do neuroepitélio. Entretanto, decidimos não aguardar até o dia 45 de cultivo, como originalmente previsto no protocolo, pois os organoides começaram a dar indícios de diminuição de tamanho. Desta maneira, a cultura foi mantida somente até o dia 41.

Decidimos utilizar três marcadores na avaliação imunocitoquímica para caracterização fenotípica e citoarquitetural dos organoides: Sox 2, β -Tubulina III (Tuj1) e neuronal nuclei (NeuN). O Sox2 foi expresso nas estruturas mais internas dos organoides, ao redor dos lúmens, que recapitulam a estrutura dos ventrículos encefálicos, indicando o fenótipo celular de progenitoras neurais e a presença da zona ventricular e o Tuj1 foi expresso em áreas mais externas dos organoides, indicando o fenótipo de neurônios maduros e a presença da placa cortical. Este resultado é condizente com a estrutura presente no encéfalo, em que as progenitoras neurais se localizam na zona ventricular e os neurônios diferenciados localizam-se mais externamente, em regiões análogas ao córtex (KELAVA; LANCASTER, 2016b). Os resultados obtidos se assemelham aos descritos por Lancaster e Knoblich (2014a). O Marcador NeuN não foi expresso pelas células, demonstrando que os neurônios diferenciados ainda estão em processo de amadurecimento, uma vez que ainda não chegaram no estágio necessário para expressar esse marcador. O NeuN é também um marcador da placa cortical, entretanto ele só começa a ser expresso, *in vitro*, em neurônios mais maduros, como indicado por Pasca e colaboradores, os quais mostraram expressão de NeuN a partir do 52 dia de diferenciação dos organoides. No prosencéfalo humano, este marcador é expresso somente após 20 semanas de gestação (PASCA et al., 2015). As falhas nas diferenciações das linhagens iPS32,33,34 e 41 podem ter sido causadas devido à variabilidade genética entre linhagens, o que pode alterar o comportamento das células ao longo dos diferentes processos, devido à qualidade das iPS descongeladas e expandidas ou ainda à mudança entre fases da diferenciação num tempo não ideal. Repetições adicionais da diferenciação com estas linhagens são necessárias para a avaliação destas hipóteses e otimização do processo de produção de organoides cerebrais a partir de hiPSCs de pacientes com TDM.

Os dois tipos de culturas *in vitro* desenvolvidas no presente estudo possuem

vantagens e limitações. A cultura em monocamada possui manutenção mais simples, demanda menor quantidade de equipamentos e portanto, menor custo. Produzem uma população celular mais homogênea e desta maneira são muito úteis em estudos de larga escala (LANCASTER; KNOBLICH, 2014a). Contudo, elas não são capazes de gerar a diversidade celular encontrada nos tecidos encefálicos e recapitular a organização arquitetônica e conexões sinápticas presentes *in vivo* (LEE et al., 2017). As culturas em suspensão são complexas e possuem populações celulares heterogêneas, permitindo uma representação mais fiel e acurada da fisiologia *in vivo*. A natureza espontânea de sua auto-organização permite a geração de diferentes tecidos encefálicos, característica importante para o estudo do TDM, uma vez que esta doença afeta diferentes regiões do encéfalo (DREVETS, 2004; QUADRATO; BROWN; ARLOTTA, 2016). Entretanto, os agregados gerados por este tipo de cultivo são mais difíceis de serem produzidos e mantidos, uma vez que demandam técnicas complexas e especializadas, como o revestimento em Matrigel, uso de agitadores e uma observação atenta sobre o tempo correto de transição entre as etapas (LANCASTER; KNOBLICH, 2014a). Este método possui ainda algumas limitações como variações de morfologia presentes entre organoides de diferentes lotes ou até mesmo dentro de um único lote, fator que dificulta muito a reprodutibilidade. Isto acontece devido à auto-organização tecidual e ao uso de Matrigel, que possui fatores animais indefinidos em sua composição (KELAVA; LANCASTER, 2016a). Uma possível alternativa para resolver este entrave é a utilização de matrizes gelatinosas sintéticas (LINDBORG et al., 2016). Outra fonte de variabilidade está associada à diversidade genética presente entre as linhagens de células-tronco, um estudo compreensivo precisaria ser conduzido para entender corretamente quais genes e vias envolvidos influenciam o processo de neurodiferenciação das iPS. Qian e colaboradores desenvolveram um minibioreator que se encaixa a uma placa de 12 poços e permite a geração de organoides em maior escala e a comparação de diferentes tipos de condições. Este equipamento reduz o espaço necessário, custos e possibilita uma maior reprodutibilidade da técnica (QIAN et al., 2016). A ausência de vascularização limita o crescimento dos organoides, uma vez que a falta de transporte de oxigênio e nutrientes para o interior dos agregados leva à necrose dos tecidos. Uma possível abordagem para solucionar esse entrave é a realização de co-culturas com células endoteliais (SCHIMEK et al., 2013) juntamente com o uso de canais microfluídicos

feitos a partir de materiais degradáveis, para permitir a remodelação vascular e crescimento de novos vasos (ROUWKEMA; KHADEMHOSEINI, 2016). A ausência de meninges e células do sistema imunológico dificultam a modelagem de respostas inflamatórias a infecções ou substâncias tóxicas, e de inflamação associada a idade. Assim como no caso da vascularização, o co-cultivo de organoides com células de diferentes tecidos poderia ser uma solução (KELAVA; LANCASTER, 2016a). Os organoides recapitulam o primeiro trimestre do desenvolvimento do encéfalo fetal, desta maneira, o estudo de doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer ou Parkinson, que costumam se manifestar em etapas mais tardias da vida, torna-se difícil. Visando contornar essa limitação, uma alternativa seria a utilização de fatores que mimetizam características do envelhecimento, como por exemplo a progerina, que é uma forma truncada da laminina A associada ao envelhecimento prematuro e que induz expressão de marcadores e características relacionadas à idade em culturas de iPSCs e neurônios (MILLER et al., 2013).

Ao compararmos as características de cada método, podemos concluir que cada um desses modelos, i.e. cultura em monocamada ou em suspensão, possuem vantagens e limitações para o estudo do TDM, portanto a escolha do melhor modelo a ser utilizado depende do objetivo de estudo. Os neurônios serotoninérgicos produzidos em monocamadas podem ser usados para medição de parâmetros como expressão gênica, morfologia celular, excitabilidade neural e formação sináptica, enquanto que os organoides cerebrais, cultivados em suspensão, são uma ferramenta importante para uma representação mais acurada das interações presentes no tecido *in vivo*, da citoarquitetura e troca de informações entre diferentes regiões encefálicas e também para o estudo do desenvolvimento encefálico (QUADRATO; BROWN; ARLOTTA, 2016).

Há ainda a possibilidade de associação do cultivo *in vitro* com outros tipos de tecnologias visando aprimorar ainda mais a modelagem de doenças neurológicas e a busca de tratamentos adequados a elas, como por exemplo a triagem de alta produtividade (do inglês High Throughput Screening ou HTS), que consiste em um método computadorizado de testes em série que utiliza sistemas robóticos para avaliar um grande número de substâncias em um curto período de tempo, técnicas de bioinformática para sequenciamento e identificação de biomarcadores diagnósticos e elucidação de mecanismos moleculares e técnicas de edição de

genoma de hiPSCs, como CRISPR-Cas9 para terapia de reposição celular personalizada (KELAVA; LANCASTER, 2016a).

Nosso estudo insere-se no contexto de desenvolvimento de modelos *in vitro* adequados ao estudo de doenças neuropsiquiátricas. Nossos dados são condizentes aos estudos de Lancaster e Knoblich (2014a) e Lu e colaboradores (2016), demonstrando a viabilidade de produção de um modelo 2D e um modelo 3D para o estudo do TDM. Entretanto, o cultivo de neurônios serotoninérgicos em monocamada possui manutenção menos complexa do que o de organoides cerebrais, desta maneira, torna-se necessária uma melhor padronização e aperfeiçoamento desta técnica de cultivo em suspensão. A produção destes modelos *in vitro*, feitas a partir de hiPSCs de pacientes com TDM configura-se como um importante passo para a futura redução do uso de modelos animais em pesquisa, elucidação de mecanismos subjacentes à doença, identificação de biomarcadores diagnósticos e triagem de fármacos de maneira personalizada, visando permitir tratamentos mais baratos, adequados e eficientes para o TDM.

6. CONCLUSÕES

De acordo com os experimentos realizados e os dados apresentados acima, podemos concluir que:

1. O processo de diferenciação das 5 linhagens de hiPSCs de pacientes com TDM em neurônios serotoninérgicos foi realizado com sucesso.
2. As células diferenciadas apresentaram expressão de marcadores presentes em neurônios serotoninérgicos e respostas positivas aos estímulos fornecidos nos testes funcionais confirmando, portanto, o fenótipo de neurônios serotoninérgicos fisiologicamente funcionais.
3. Das 5 linhagens de hiPSCs de pacientes com TDM diferenciadas em organoides cerebrais, somente uma chegou ao final do processo.
4. A linhagem diferenciada apresentou expressão de marcadores presentes em

organoides cerebrais, confirmando o fenótipo correto dos tipos celulares presentes e sua organização na citoarquitetura correta.

5. Mais estudos devem ser realizados visando ao aperfeiçoamento, padronização e maior reprodutibilidade da produção de organoides cerebrais a partir de hiPSCs de pacientes com TDM.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKASHI, H. et al. Prefrontal cortex activation is associated with a discrepancy between self- and observer-rated depression severities of major depressive disorder: A multichannel near-infrared spectroscopy study. **Journal of Affective Disorders**, v. 174, p. 165–172, 2015.

ALBERT, P. R. Transcriptional regulation of the 5-HT_{1A} receptor: implications for mental illness. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 367, n. 1601, p. 2402–2415, 2012.

ALBERT, P. R.; BENKELFAT, C.; DESCARRIES, L. The neurobiology of depression-revisiting the serotonin hypothesis. I. cellular and molecular mechanisms. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 367, n. 1601, p. 2378–2381, 2012.

AUGUSTI-TOCCO, G.; SATO, G. Establishment of Functional Clonal Lines of Neurons from Mouse Neuroblastoma. v. 64, n. 1, p. 311–315, 1969.

AVIOR, Y.; SAGI, I.; BENVENISTY, N. Pluripotent stem cells in disease modelling and drug discovery. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 17, p. 170, 28 jan. 2016.

BERRIDGE, M. J.; LIPP, P.; BOOTMAN, M. D. The versatility and universality of calcium signalling. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 1, p. 11, 1 out. 2000.

BRENNAND, K. et al. Modeling schizophrenia using hiPSC neurons. **Nature**, v. 473, n. 7346, p. 221–225, 12 maio 2011.

BRUNONI, A. R. et al. The sertraline vs electrical current therapy for treating depression clinical study. **JAMA Psychiatry**, v. 70, n. 4, p. 383–391, 2013.

CONTI, L.; CATTANEO, E. Neural stem cell systems: physiological players or in vitro entities? **Nature Reviews Neuroscience**, v. 11, p. 176, 28 jan. 2010.

COPPEN, A. The biochemistry of affective disorders. **The British journal of psychiatry : the journal of mental science**, v. 113, n. 504, p. 1237–1264, 1967.

CUGOLA, F. R. et al. The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. **Nature**, v. advance on, 11 maio 2016.

DANG, J. et al. Zika Virus Depletes Neural Progenitors in Human Cerebral Organoids through Activation of the Innate Immune Receptor TLR3. **Cell stem cell**, v. 19, n. 2, p. 258–265, 4 ago. 2016.

DE-MIGUEL, F. F. **Steps in the formation of neurites and synapses studied in cultured leech neurons Brazilian Journal of Medical and Biological Research scielo** , , 2000.

DEFELIPE, J. The Evolution of the Brain, the Human Nature of Cortical Circuits, and Intellectual Creativity. **Frontiers in Neuroanatomy**, v. 5, n. May, p. 1–17, 2011.

DREVETS, W. C. Neuroplasticity in mood disorders. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 6, n. 2, p. 199–216, jun. 2004.

EARLE, W. R. et al. Production of malignancy in vitro. iv. the mouse fibroblast cultures and changes seen in the living cells. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 4, n. 2, p. 165–212, 1943.

EICHLER, H. G. et al. New drug approval success rate in Europe in 2009. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 9, n. 5, p. 355–356, 2010.

EIRAKU, M. et al. Self-Organized Formation of Polarized Cortical Tissues from ESCs and Its Active Manipulation by Extrinsic Signals. **Cell Stem Cell**, v. 3, n. 5, p. 519–532, 2008.

EIRAKU, M. et al. Self-organizing optic-cup morphogenesis in three-dimensional culture. **Nature**, v. 472, p. 51, 6 abr. 2011.

ELKABETZ, Y. et al. Human ES cell-derived neural rosettes reveal a functionally distinct early neural stem cell stage. **Genes & Development**, v. 22, n. 2, p. 152–165, 15 jan. 2008.

FALK, A. et al. Modeling psychiatric disorders: From genomic findings to cellular phenotypes. **Molecular Psychiatry**, v. 21, n. 9, p. 1167–1179, 2016.

GARCEZ, P. P. et al. Zika virus impairs growth in human neurospheres and brain organoids. **Science (New York, N.Y.)**, v. 352, n. 6287, p. 816–818, maio 2016.

HARMER, C. J.; COWEN, P. J.; B, P. T. R. S. neuropsychological account of SSRI action in depression ‘ It ’ s the way that you look at it ’ — a cognitive neuropsychological account of SSRI action in depression. n. February, 2013.

HARRISON, R. G. et al. Observations of the living developing nerve fiber. **The Anatomical Record**, v. 1, n. 5, p. 116–128, 1907.

HERCULANO-HOUZEL, S. The Human Brain in Numbers: A Linearly Scaled-up Primate Brain . **Frontiers in Human Neuroscience**, v. 3, p. 31, 9 nov. 2009.

HESSELGRAVE, N.; PARSEY, R. V. Imaging the serotonin 1A receptor using [11C]WAY100635 in healthy controls and major depression. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 368, n. 1615, p. 20120004, 2013.

HO, B. X.; PEK, N. M. Q.; SOH, B.-S. Disease Modeling Using 3D Organoids Derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 4, p. 936, 21 abr. 2018.

HYDÉN, H. Quantitative assay of compounds in isolated, fresh nerve cells and glial cells from control and stimulated animals. **Nature**, v. 83, p. 1822–1823, 1959.

KADOSHIMA, T. et al. Self-organization of axial polarity, inside-out layer pattern, and species-specific progenitor dynamics in human ES cell–derived neocortex. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of**

America, v. 110, n. 50, p. 20284–20289, 10 dez. 2013.

KAITIN, K. I. Deconstructing the drug development process: The new face of innovation. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 87, n. 3, p. 356–361, 2010.

KANDEL, E. R. et al. **Principles of Neural Science, Fifth Edition**. [s.l.] McGraw-Hill Education, 2013.

KELAVA, I.; LANCASTER, M. A. Stem Cell Models of Human Brain Development. **Cell Stem Cell**, v. 18, n. 6, p. 736–748, 2016a.

KELAVA, I.; LANCASTER, M. A. Dishing out mini-brains: Current progress and future prospects in brain organoid research. **Developmental Biology**, v. 420, n. 2, p. 199–209, 15 dez. 2016b.

KESSLER, R. C. et al. Lifetime prevalence and age-of-onset distributions of mental disorders in the World Health Organization's World Mental Health Survey Initiative. **World psychiatry : official journal of the World Psychiatric Association (WPA)**, v. 6, n. 3, p. 168–76, 2005.

KRISHNAN, V.; NESTLER, E. J. Animal Models of Depression: Molecular Perspectives. **Brain Imaging in Behavioral Neuroscience**, n. November 2011, p. 289–320, 2011.

LANCASTER, M. et al. Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. **Nature**, v. 501, n. 2, p. 373–381, 2013.

LANCASTER, M. A.; KNOBLICH, J. A. Generation of cerebral organoids from human pluripotent stem cells. **Nature Protocols**, v. 9, n. 10, p. 2329–2340, 2014a.

LANCASTER, M. A.; KNOBLICH, J. A. Organogenesis in a dish: Modeling development and disease using organoid technologies. **Science**, v. 345, n. 6194, 2014b.

LAPHAM, L. W.; MARKESBERY, W. R. Human Fetal Cerebellar Cortex: Organization and Maturation of Cells in vitro. 1971.

LATTIMORE, K. A. et al. Selective Serotonin Reuptake Inhibitor (SSRI) Use during Pregnancy and Effects on the Fetus and Newborn: A Meta-Analysis. **Journal Of Perinatology**, v. 25, p. 595, 14 jul. 2005.

LEE, C. T. et al. 3D brain Organoids derived from pluripotent stem cells: Promising experimental models for brain development and neurodegenerative disorders Julie Y.H. Chan. **Journal of Biomedical Science**, v. 24, n. 1, p. 1–12, 2017.

LINDBORG, B. A. et al. Rapid Induction of Cerebral Organoids From Human Induced Pluripotent Stem Cells Using a Chemically Defined Hydrogel and Defined Cell Culture Medium. **Stem Cells Translational Medicine**, p. 1–10, 2016.

LONG, G. The Biopharmaceutical Pipeline - Innovative Therapies in Clinical Development. n. December, 2017.

LU, J. et al. Generation of serotonin neurons from human pluripotent stem cells. **Nature biotechnology**, v. 34, n. 1, p. 89–94, 14 jan. 2016.

MARCHETTO, M. C. et al. Induced pluripotent stem cells (iPSCs) and neurological disease modeling: Progress and promises. **Human Molecular Genetics**, v. 20, n. R2, p. 109–115, 2011.

MARCHETTO, M. C. et al. Altered proliferation and networks in neural cells derived from idiopathic autistic individuals. **Molecular Psychiatry**, v. 22, n. 6, p. 820–835, 2017.

MARCHETTO, M. C. N. et al. A model for neural development and treatment of Rett syndrome using human induced pluripotent stem cells. **Cell**, v. 143, n. 4, p. 527–539, nov. 2010.

MARIANI, J. et al. FOXP1-Dependent Dysregulation of GABA/Glutamate Neuron Differentiation in Autism Spectrum Disorders. **Cell**, v. 162, n. 2, p. 375–390, 2015.

MATHERS, C. D.; LONCAR, D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. **PLoS Medicine**, v. 3, n. 11, p. 2011–2030, 2006.

MATTHEWS, K. et al. Animal models of depression: navigating through the clinical fog. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 29, n. 4, p. 503–513, 2005.

MCGONIGLE, P.; RUGGERI, B. Animal models of human disease: Challenges in enabling translation. **Biochemical Pharmacology**, v. 87, n. 1, p. 162–171, 2014.

MEDINE, C. N. et al. Developing High-Fidelity Hepatotoxicity Models From Pluripotent Stem Cells. **Stem Cells Translational Medicine**, v. 2, n. 7, p. 505–509, 11 jul. 2013.

MERTENS, J. et al. Differential responses to lithium in hyperexcitable neurons from patients with bipolar disorder. **Nature**, v. 527, n. 7576, p. 95–99, 5 nov. 2015.

MILLER, J. D. et al. Human iPSC-based modeling of late-onset disease via progerin-induced aging. **Cell Stem Cell**, v. 13, n. 6, p. 691–705, 2013.

MOUSSAVI, S.; CHATTERJI, S. Depression, chronic diseases, and decrements in health: results from the World Health Surveys. **Lancet**, v. 370, p. 851–858, 2007.

MUGURUMA, K. et al. Self-organization of polarized cerebellar tissue in 3D culture of human pluripotent stem cells. **Cell Reports**, v. 10, n. 4, p. 537–550, 2015.

MURRY, C. E.; KELLER, G. Differentiation of Embryonic Stem Cells to Clinically Relevant Populations: Lessons from Embryonic Development. **Cell**, v. 132, n. 4, p. 661–680, 2008.

PASCA, A. M. et al. Functional cortical neurons and astrocytes from human pluripotent stem cells in 3D culture. **Nature Methods**, v. 12, n. 7, p. 671–678, 2015.

POWELL, C. M.; MIYAKAWA, T. Schizophrenia-Relevant Behavioral Testing in Rodent Models: A Uniquely Human Disorder? **Biological psychiatry**, v. 59, n. 12, p.

1198–1207, 15 jun. 2006.

PRICE, D. J. et al. **Building Brains: An Introduction to Neural Development**. [s.l.] Wiley, 2011.

QIAN, X. et al. Brain Region-specific Organoids using Mini-bioreactors for Modeling ZIKV Exposure. **Cell**, v. 165, n. 5, p. 1238–1254, 19 maio 2016.

QUADRATO, G.; BROWN, J.; ARLOTTA, P. The promises and challenges of human brain organoids as models of neuropsychiatric disease. **Nature Medicine**, v. 22, n. 11, p. 1220–1228, 2016.

RAJKOWSKA, G. Depression: What we can learn from postmortem studies. **Neuroscientist**, v. 9, n. 4, p. 273–284, 2003.

REESE, D.; DRAPEAU, P. Neurite Growth Patterns Leading to Functional Synapses in an Identified Embryonic Neuron. **The Journal of Neuroscience**, v. 18, n. 15, p. 5652 LP-5662, 1 ago. 1998.

RICE, D. P.; KELMAN, S.; MILLER, L. S. Estimates of economic costs of alcohol and drug abuse and mental illness, 1985 and 1988. **Public Health Rep.**, v. 106, n. 3, p. 280–292, 1991.

ROBICSEK, O. et al. Abnormal neuronal differentiation and mitochondrial dysfunction in hair follicle-derived induced pluripotent stem cells of schizophrenia patients. **Molecular Psychiatry**, v. 18, p. 1067, 4 jun. 2013.

ROTH, G.; DICKE, U. Evolution of the brain and intelligence. **Trends in Cognitive Sciences**, v. 9, n. 5, p. 250–257, 2005.

ROUWKEMA, J.; KHADEMHOSEINI, A. Vascularization and Angiogenesis in Tissue Engineering: Beyond Creating Static Networks. **Trends in Biotechnology**, v. 34, n. 9, p. 733–745, 1 set. 2016.

SAKAGUCHI, H. et al. Generation of functional hippocampal neurons from self-organizing human embryonic stem cell-derived dorsomedial telencephalic tissue. **Nature Communications**, v. 6, p. 8896, 17 nov. 2015.

SARTORE, R. C. et al. Trace elements during primordial plexiform network formation in human cerebral organoids. **PeerJ**, v. 5, p. e2927, 25 jul. 2017.

SATO, T. et al. Single Lgr5 stem cells build crypt–villus structures in vitro without a mesenchymal niche. **Nature**, v. 459, p. 262, 29 mar. 2009.

SCHILDKRAUT, J. J. The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. **American Journal of Psychiatry**, v. 122, n. 5, p. 509–522, 1965.

SCHIMEK, K. et al. Integrating biological vasculature into a multi-organ-chip microsystem. **Lab on a Chip**, v. 13, n. 18, p. 3588–3598, 2013.

SCHUBERT, D. et al. In vitro differentiation of a mouse neuroblastoma. **Proceedings**

of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 64, n. 1, p. 316–323, 1969.

SHROFF, G.; DHANDA TITUS, J.; SHROFF, R. A review of the emerging potential therapy for neurological disorders: human embryonic stem cell therapy. **American journal of stem cells**, v. 6, n. 1, p. 1–12, 2017.

SIBBALD, B. Rofecoxib (Vioxx) voluntarily withdrawn from market. **CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne**, v. 171, n. 9, p. 1027–1028, 2004.

SOLIMAN, M. A. et al. Pluripotent stem cells in neuropsychiatric disorders. **Molecular Psychiatry**, v. 22, n. 9, p. 1241–1249, 21 set. 2017.

STILES, J.; JERNIGAN, T. L. The Basics of Brain Development. **Neuropsychology Review**, v. 20, n. 4, p. 327–348, 3 dez. 2010.

SUGA, H. et al. Self-formation of functional adenohypophysis in three-dimensional culture. **Nature**, v. 480, p. 57, 9 nov. 2011.

SULLIVAN, P. F.; NEALE, M. C.; KENDLER, K. S. Genetic Epidemiology of Major Depression: Review and Meta-Analysis. **American Journal of Psychiatry**, v. 157, n. 10, p. 1552–1562, 2000.

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, 2006a.

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. 663–76, ago. 2006b.

TALATI, A.; WEISSMAN, M. M.; HAMILTON, S. P. Using the high-risk family design to identify biomarkers for major depression. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 368, n. 1615, 2013.

TARGUM, S. D. Identification and treatment of antidepressant tachyphylaxis. **Innovations in Clinical Neuroscience**, v. 11, n. 3–4, p. 24–28, 2014.

THOMSON, J. A. et al. Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. v. 282, n. November, p. 1145–1147, 1998.

TOFOLI, F. A. et al. Increasing The Genetic Admixture of Available Lines of Human Pluripotent Stem Cells. **Scientific Reports**, v. 6, p. 34699, 6 out. 2016.

TRIVEDI, M. H. et al. Evaluation of outcomes with citalopram for depression using measurement-based care in STAR*D: Implications for clinical practice. **American Journal of Psychiatry**, v. 163, n. 1, p. 28–40, 2006.

VADODARIA, K. C. et al. Serotonin in psychiatry: in vitro disease modeling using patient-derived neurons. **Cell and Tissue Research**, v. 371, n. 1, p. 161–170, 2018.

VOS, T., ALLEN, C., ARORA, M., et al. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 310 diseases and injuries, 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. **Lancet**, v. 388, n. 10053, p. 1545–1602, 8 out. 2016.

WEN, Z. et al. Synaptic dysregulation in a human iPS cell model of mental disorders. **Nature**, v. 515, n. 7527, p. 414–418, 20 nov. 2014.

WEN, Z. et al. Modeling psychiatric disorders with patient-derived iPSCs. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 36, p. 118–127, 2016.

WHITAKER-AZMITIA, P. M. Serotonin and brain development: Role in human developmental diseases. **Brain Research Bulletin**, v. 56, n. 5, p. 479–485, 2001.

YAN, Y. et al. Efficient and Rapid Derivation of Primitive Neural Stem Cells and Generation of Brain Subtype Neurons From Human Pluripotent Stem Cells. p. 862–870, 2013.

YING, Q.-L. et al. Conversion of embryonic stem cells into neuroectodermal precursors in adherent monoculture. **Nature Biotechnology**, v. 21, p. 183, 13 jan. 2003.

ZHANG, S.-C. et al. In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells. **Nature Biotechnology**, v. 19, p. 1129, 1 dez. 2001.

8. BIOGRAFIA

Yasmin Rana de Miranda Silva

Nome usado em citações: RANA-DE-MIRANDA, Y., RANA-MIRANDA, Y., MIRANDA, Y. R., RANA, Y.

Filiação: Solange Rana de Miranda e João Alves da Silva

Nascimento: 05/10/1988 – São Paulo/SP – Brasil

Carteira de Identidade 46043097-X - SP – 15/11/14

CPF 370751948-10

Endereço Profissional: Laboratório Nacional de Células-Tronco Embrionárias (LaNCE) – SP, Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, Rua do Matão, 277, sala 300 - São Paulo, SP - Brasil - CEP 05508-090

Telefones de contato: +55 (11) 3091-7476/+55 (11) 942867864

E-mail: yasmin.rana18@gmail.com/ yasmin.silva@usp.br

Formação acadêmica/titulação

2016 - 2018

Mestrado em andamento em Ciências Biológicas (Genética) (Conceito CAPES 5).
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

Título: Estabelecimento de organoides cerebrais como um modelo in vitro para doenças neurológicas, Orientador: Lygia Pereira da Veiga Carramaschi.
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, Brasil.

Palavras-chave: células-tronco; diferenciação neural; organoides; iPSCs; neurociências.

Grande área: Ciências Biológicas

Grande Área: Ciências Biológicas / Área: Fisiologia / Subárea: neurociências.

2008 – 2014

Graduação em Ciências Biológicas.

Universidade de São Paulo, USP, Brasil

Período sanduíche em The University of Sydney (Orientador: Michael Valenzuela).

Título: Análise das três principais mutações causadoras da doença de Gaucher no Brasil em pacientes com doença de Parkinson.

Orientador: Dra. Lygia da Veiga Pereira.

Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, Brasil.

2008 – 2012

Graduação em Ciências Biológicas (Licenciatura).
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

Formação complementar

2016 - 2016

Extensão universitária em Workshop sobre tecnologias avançadas para separação celular e iPSCs. (Carga horária: 4h).
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

2014 - 2014

Extensão universitária em I Curso de Inverno em Microbiologia e Biologia Molecular. (Carga horária: 40h).
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

2012 - 2012

Excel. (Carga horária: 8h). Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

2011 - 2011

Extensão universitária em Glia. (Carga horária: 12h). Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

2011 - 2011

Extensão universitária em Enriquecimento Ambiental, Comportamento e Bem-estar. (Carga horária: 12h). Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

2010 - 2010

Extensão universitária em Alzheimer. (Carga horária: 12h). Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

2009 - 2009

Extensão universitária em Visão: Uma Perspectiva Multidisciplinar. (Carga horária: 12h).
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

2009 - 2009

Extensão universitária em Evolução do Sistema Nervoso. (Carga horária: 12h).
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

2009 - 2009

Extensão universitária em I Curso de Neurociências e Comportamento. (Carga horária: 12h).
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

2008 - 2008

Extensão universitária em Metodologia de Estudos de Peixes. (Carga horária: 12h).
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

2008 - 2008

Extensão universitária em Metodologia de Estudos de Aves. (Carga horária: 12h).
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

2008 - 2008

Extensão universitária em Metodologia de Estudos de Répteis e Anfíbios. (Carga horária: 12h).
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

2008 - 2008

Extensão universitária em Amostragem e Preservação de Mamíferos. (Carga horária: 12h).
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

2008 - 2008

Extensão universitária em Répteis e Anfíbios. Diversidade e Conservação. (Carga horária: 12h).
Fundação Parque Zoológico de São Paulo, FPZSP, Brasil.

2008 - 2008

Extensão universitária em Serpentes (Sobrevivência, Defesa, Alimentação). (Carga horária: 12h).
Fundação Parque Zoológico de São Paulo, FPZSP, Brasil.

2008 - 2008

Extensão universitária em Princípios da Construção e Manutenção de Terrários. (Carga horária: 4h).
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

Atuação profissional**Universidade de São Paulo – USP - Brasil****Vínculo institucional****2016 - 2018**

Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Desenvolvimento de projeto de Mestrado, Carga horária: 40h, Regime: Dedicação exclusiva.

Vínculo institucional**2017 – 2017**

Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Monitora PAE, Carga horária: 6h

Outras informações

Monitora bolsista do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE) da disciplina de graduação BIF0217 - Fisiologia Animal: Comunicação e Integração. Preparação e manutenção de materiais de laboratório em aulas práticas, correção de atividades e

esclarecimento de dúvidas em aulas teóricas para alunos do Curso de Ciências Biológicas da disciplina BIF0217 - Fisiologia Animal: Comunicação e Integração, ministrada pelos professores: Dr. Gilberto Fernando Xavier, Dr. André Frazão Helene e Dra Gisele Akemi Oda.

Vínculo institucional

2012 – 2012

Vínculo: Associado em Empresa Jr., Enquadramento Funcional: Gerência de Projeto em Empresa Jr., Carga horária: 10h

Outras informações

Gerente do projeto: Exposição "O que esperamos encontrar em nossas cabeças" realizado pela Empresa Bio Jr. USP Organização de ideias para a exposição, levantamento de materiais e custos, e busca de informações teóricas na literatura.

Vínculo institucional

2012 - 2012

Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Monitora de Disciplina da Graduação, Carga horária: 6h

Outras informações

Monitora bolsista da disciplina de graduação BIF0217 - Fisiologia Animal: Comunicação e Integração. Preparação e manutenção de materiais de laboratório em aulas práticas e esclarecimento de dúvidas em aulas teóricas para alunos do Curso de Ciências Biológicas da disciplina BIF0217 - Fisiologia Animal: Comunicação e Integração, ministrada pelos professores: Dr. Gilberto Fernando Xavier, Dr. André Frazão Helene e Dra Gisele Akemi Oda.

Vínculo institucional

2011 – 2011

Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Monitora de Disciplina da Graduação, Carga horária: 6h

Outras informações

Monitora bolsista da disciplina de graduação BMM0280 - Microbiologia Básica Preparação e manutenção de materiais de laboratório em aulas práticas e esclarecimento de dúvidas em aulas teóricas para alunos do Curso de Ciências Biológicas da disciplina BMM0280 - Microbiologia Básica, ministrada pelos professores: Dra Charlotte Marianna Harsi, Dr. Mário Henrique de Barros, Dr. Paolo Marinho de Andrade Zanotto, Dra Elisabete José Vicente, Dr. Carlos Pelleschi Taborda.

Vínculo institucional

2011 – 2011

Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Monitora de Disciplina da Graduação, Carga horária: 8h

Outras informações

Monitora bolsista da disciplina de graduação BMM0290 - Microbiologia Preparação e manutenção de materiais de laboratório em aulas práticas e esclarecimento de dúvidas em aulas teóricas para alunos do Curso de Ciências Biológicas da disciplina BMM0290 - Microbiologia, ministrada pelos professores: Dra. Heloiza Ramos Barboza, Dra Marilis do Valle Marques e Dr. Carlos Frederico Martins Menck.

Vínculo institucional

2010 – 2010

Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Monitora de Disciplina da Graduação, Carga horária: 6h

Outras informações

Monitora bolsista da disciplina de graduação BIF0217 - Fisiologia Animal: Comunicação e Integração. Preparação e manutenção de materiais de laboratório em aulas práticas e esclarecimento de dúvidas em aulas teóricas para alunos do Curso de Ciências Biológicas da disciplina BIF0217 - Fisiologia Animal: Comunicação e Integração, ministrada pelos professores: Dr. Gilberto Fernando Xavier, Dr. André Frazão Helene e Dra Gisele Akemi Oda.

Vínculo institucional

2010 – 2010

Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Monitora de Disciplina da Graduação, Carga horária: 8

Outras informações

Monitora bolsista da disciplina de graduação BMM0290 - Microbiologia Preparação e manutenção de materiais de laboratório em aulas práticas e esclarecimento de dúvidas em aulas teóricas para alunos do Curso de Ciências Biológicas da disciplina BMM0290 - Microbiologia, ministrada pelos professores: Dra. Heloiza Ramos Barboza, Dra Marilis do Valle Marques e Dr. Carlos Frederico Martins Menck.

Atividades

03/2014 - 08/2014

Estágios, Instituto de Biociências, Departamento de Genética.

Estágio realizado

Realização de análise molecular das três principais mutações causadoras da doença de Gaucher no Brasil em pacientes com doença de Parkinson visando estudar a interação entre as duas doenças..

07/2010 - 08/2012

Estágios , Instituto de Biociências, Departamento de Fisiologia Geral.

Estágio realizado

Projeto de pesquisa que visou investigar se o enriquecimento ambiental realizado em ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) promove melhora na memória de reconhecimento social em relação a ratos mantidos em biotérios convencionais..

03/2011 - 08/2011

Estágios, Instituto de Ciências Biomédicas, Departamento de Microbiologia.

Estágio realizado

Projeto de pesquisa financiado pela companhia Vale do Rio Doce que estudou o melhoramento genético de microrganismos visando a biorremediação de efluentes de metais pesados.

2013 - 2014**Vínculo institucional**

Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Estagiária, Carga horária: 20

The University of Sydney – U. Sydney – Austrália

Outras informações

Estagiária no Brain and Mind Research Institute (BMRI) Atuação junto ao Regenerative Neuroscience Group auxiliando no projeto que visa estudar neuoprecusores provenientes de células da pele, um tipo de células tronco recentemente descoberto com potencial para ser uma ferramenta no tratamento de doenças neurodegenerativas.

Projetos de Pesquisa**2016 - Atual**

Estabelecimento de neurônios serotoninérgicos e organoides cerebrais como modelos *in vitro* para o Transtorno Depressivo Maior.

Descrição: As células-tronco pluripotentes induzidas humanas (hiPSCs) possuem grande potencial para tratamentos de regeneração de tecidos, modelagem *in vitro* e teste de fármacos. Não há até o momento nenhum registro de geração de modelos *in vitro* a partir de hiPSCs de pacientes com Transtorno Depressivo Maior (TDM). No presente projeto propusemos a produção e caracterização de neurônios serotoninérgicos, por cultura de monocamada e de organoides cerebrais, por cultivo em suspensão, a partir de hiPSCs de pacientes com TDM.

Situação: Em andamento; Natureza: Pesquisa.

Alunos envolvidos: Mestrado acadêmico: (1)

Integrantes: Yasmin Rana de Miranda Silva - Integrante / Lygia da Veiga Pereira - Coordenador.

Financiador(es): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Bolsa.

2014 – 2014

Análise das três principais mutações causadoras da doença de Gaucher no Brasil em pacientes com doença de Parkinson

Descrição: Realização de análise molecular das três principais mutações causadoras da doença de Gaucher no Brasil em pacientes com doença de

Parkinson visando estudar a interação entre as duas doenças.
Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa.

Alunos envolvidos: Graduação: (1) / Mestrado acadêmico: (1) / Doutorado: (1).
Integrantes: Yasmin Rana de Miranda Silva - Integrante / Lygia da Veiga Pereira - Coordenador / Fabiano Tófoli de Araújo - Integrante / Lucas Assis Pereira - Integrante.

2011 – 2012

Influência do enriquecimento ambiental na memória de reconhecimento social em ratos Wistar

Descrição: O projeto visa investigar se o enriquecimento ambiental realizado em ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) promove melhora na memória de reconhecimento social em relação à ratos mantidos em biotérios convencionais.

Situação: Desativado; Natureza: Pesquisa.

Alunos envolvidos: Graduação: (1)

Integrantes: Yasmin Rana de Miranda Silva - Integrante / Gilberto Fernando Xavier - Coordenador.

Apresentação de trabalho

RANA-MIRANDA, Y., PEREIRA, L.A., ARMENTEIRO, Y.M., ARAÚJO, F.T., MORATO-MARQUES, M., MOTTA-TEIXEIRA, L.C., CASTILLO, A.R.G.L., MORENO, M., ULRICH, A.H., LOTUFO, P.A., BRUNONI, A.R., PEREIRA, L.V. Production of serotonergic neurons from Major Depressive Disorder patients of the ELECT clinical trial. XLI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento (SBNeC) 2018