

## ORGANOIDES CEREBRAIS: HISTÓRIA, ASPECTOS MORFOFUNCIONAIS E PERSPECTIVAS DE APLICAÇÃO

 <https://doi.org/10.56238/sevened2024.029-002>

**Carreiro Ramalho**

Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas, Rua José Lourenço Kelmer, s/n, São Pedro, CEP: 36036-900, Juiz de Fora, MG, Brazil.  
ORCID: 0000-0003-1227-2321

**Carlos Magno da Costa Maranduba**

Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas, Rua José Lourenço Kelmer, s/n, São Pedro, CEP: 36036-900, Juiz de Fora, MG, Brazil.  
ORCID: 0000-0001-7327-1934

**Fernando de Sá Silva**

Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Governador Valadares, Departamento de Ciências Básicas da Vida, Rua São Paulo, 745, Centro, CEP: 35010-180, Governador Valadares, MG, Brazil.  
ORCID: 0000-0003-0821-5535

---

### RESUMO

Um dos principais objetivos da neurobiologia é entender o desenvolvimento e a disfunção do cérebro humano. Muitas das ferramentas e técnicas que informaram nossa compreensão do desenvolvimento do cérebro humano não podem capturar totalmente as características únicas e dinâmicas do desenvolvimento do cérebro humano. Avanços recentes nas tecnologias de células-tronco que permitem a geração de organoides cerebrais humanos a partir de células-tronco pluripotentes (PSCs) prometem mudar profundamente nossa compreensão do desenvolvimento do cérebro humano e permitir um estudo detalhado da patogênese de doenças cerebrais hereditárias e adquiridas. Nesta revisão, apresentaremos uma visão geral do desenvolvimento da tecnologia de organoides cerebrais, seu progresso e aplicações atuais e perspectivas futuras dessa tecnologia.

**Palavras-chave:** Organoides cerebrais. Neurodesenvolvimento. Doenças neurodegenerativas. Células-tronco. Vasculatura.

## 1 INTRODUÇÃO

Há uma preocupação crescente na medicina moderna em entender melhor como o cérebro se forma e funciona, bem como os mecanismos que promovem e sustentam doenças neurológicas, a fim de desenvolver e melhorar intervenções e tratamentos para as fragilidades humanas. No entanto, estudar o neurodesenvolvimento, os circuitos neurais e os distúrbios neurológicos associados é altamente desafiador. O cérebro é um órgão de grande complexidade e, até hoje, permanece de difícil acesso para investigações experimentais em humanos. Esse acesso é limitado principalmente a amostras de tecido post-mortem ou tecidos removidos cirurgicamente, bem como ao uso de métodos não invasivos, como neuroimagem, estimulação magnética transcraniana e monitoramento eletrofisiológico (Komssi & Kähkönen, 2006; Stan et al., 2006; Brammer, 2009; Eyal et al., 2016). Todos esses métodos têm limitações, necessitando do desenvolvimento de novos procedimentos. Outras restrições estão relacionadas à existência de diferenças nos circuitos cerebrais e variações anatômicas decorrentes da interação entre a heterogeneidade genética dos indivíduos e a exposição ao ambiente, bem como variações nas técnicas de processamento e preservação de tecidos do sistema nervoso central humano (SNC) (Adams et al., 2019).

A análise post-mortem do tecido do SNC tem sido historicamente o meio mais acessível de estudar fenótipos em condições neuropatológicas. Embora os fundamentos da neurociência moderna dependam de séculos de exames de tecidos post-mortem humanos, permitindo o estudo de características específicas do cérebro humano, como a neuroanatomia (Moon et al., 2010), essa abordagem é insuficiente para fornecer insights sobre o funcionamento e o desenvolvimento neural (Kelava e Lancaster, 2016a; Adams et al., 2019). No entanto, trabalhar com tecidos cerebrais humanos *in vivo* é extremamente desafiador, mas essencial para estudos sobre os princípios biológicos do desenvolvimento e patologias do cérebro humano. Consequentemente, a neuroimagem funcional e os modelos animais (principalmente roedores e primatas) surgiram como as alternativas mais viáveis hoje (Jay et al., 2011; Partridge e Rossmesl, 2019; Seeman e Madras, 2013). No entanto, existem diferenças significativas entre as espécies, agravadas pela heterogeneidade de idade, sexo e patologia dentro das espécies sob investigação, apresentando considerações que devem ser ponderadas no desafio de interpretar o que é consistente entre as descobertas científicas (Elston et al., 2001; DeFelipe et al., 2002; Roth e Dicke, 2005; Herculano-Houzel, 2009; Mohan et al., 2015; Muotri, 2016; Kelava e Lancaster, 2016b; Adams et al., 2019).

Consequentemente, os pesquisadores têm se esforçado para desenvolver e otimizar sistemas *in vitro* para cultura de células neurais, auxiliando na compreensão do desenvolvimento, funcionamento do SNC e da patogênese subjacente de doenças neurológicas. O avanço das tecnologias relacionadas à aquisição, manipulação e cultivo de células-tronco (CTs) tem surgido como uma nova alternativa para o estudo do SNC. As células-tronco embrionárias humanas (hESCs) podem ser induzidas em

células-tronco neurais e, posteriormente, diferenciadas em células mais especializadas, como neurônios e células gliais. No entanto, devido às preocupações éticas em torno de sua aquisição, as hESCs foram minimamente adotadas em estudos *in vitro*. Outra opção envolve considerar o uso de células-tronco adultas, comumente conhecidas como células-tronco pluripotentes (PSCs), responsáveis pela renovação e reparo do tecido adulto. No entanto, sabe-se que esse tipo de célula é menos versátil que as hESCs e incapaz de mimetizar o desenvolvimento do SNC, limitando seu uso em tais pesquisas. A reprogramação celular, no entanto, apresenta uma alternativa viável para esses desafios. Esta técnica envolve a reversão de células somáticas específicas do tecido de um doador, através da manipulação da expressão gênica usando fatores de transcrição de células-tronco, para um estado pluripotente, resultando na formação de células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs). As iPSCs carregam o genótipo do doador (ou paciente) e possuem a mesma capacidade de diferenciação que as hESCs, sendo induzíveis nos tipos celulares mencionados. Portanto, as iPSCs permitem a modulação direta e não invasiva de fenótipos celulares relevantes relacionados aos aspectos clínicos das doenças de interesse, representando um sistema de modelagem não invasivo, específico do paciente e eticamente aceitável. Além disso, novas técnicas de edição de genoma, como o sistema CRISPR/Cas9, que visa alterar especificamente a informação genética de células humanas (Hockemeyer e Jaenisch, 2016), provaram ser aliadas significativas nesse sentido.

Apesar da existência de vários protocolos de diferenciação neuronal *in vitro*, a maioria é baseada em um sistema de cultura bidimensional (também conhecido como cultura 2D ou cultura de monocamada). Uma das vantagens é a acessibilidade uniforme das CC aos fatores de crescimento e diferenciação, bem como a diferenciação uniforme das CC, auxiliando na homogeneidade dos resultados do estudo. No entanto, entre as desvantagens da cultura 2D, especialmente na simulação do desenvolvimento do cérebro humano, destaca-se a ausência de interações célula-célula e célula-matriz, que regulam etapas importantes do desenvolvimento neurológico (Koo et al., 2019).

Portanto, tornou-se necessário desenvolver um sistema modelo que fosse mais fiel ao ambiente de desenvolvimento do cérebro humano. Esses processos culminaram na geração da 'tecnologia organoide'. Organoides são estruturas obtidas por meio de culturas tridimensionais (3D), que passam por algum nível de auto-organização e se assemelham, pelo menos em parte, a órgãos *in vivo* e seus tipos celulares específicos. Os organoides cerebrais atualmente em desenvolvimento ainda são bastante distintos do cérebro humano (que é muito mais complexo), mas podem mimetizar, até certo ponto, *in vitro*, características presentes no neurodesenvolvimento e neuropatologias *in vivo* (Lancaster e Knoblich, 2014a; Qian et al., 2019).

Até agora, uma diversidade de protocolos para geração de organoides foi desenvolvida e publicada para diferentes propósitos, como modelagem do desenvolvimento cortical (Lancaster et al., 2013; Birey et al., 2017), bem como modelar o desenvolvimento de outras áreas e regiões específicas

do cérebro humano, por exemplo, o hipocampo (Sakaguchi, H. et al., 2015), mesencéfalo (Monzel et al., 2017), cerebelo (Muguruma et al., 2015), entre outros. Um dos objetivos dos organoides é justamente produzir modelos de doenças neurológicas que afetem regiões cerebrais específicas. Outras aplicações para organoides cerebrais são abordadas mais detalhadamente por Adams (Adams et al., 2019).

A tecnologia organoide avançou significativamente a pesquisa sobre doenças relacionadas ao desenvolvimento neurológico, bem como a investigação de doenças neurodegenerativas. Apesar de seu potencial, no entanto, muitos desafios e limitações técnicas permanecem (DiLullo e Kriegstein, 2017; Pasca, 2018). Essa tecnologia ainda está em seus estágios iniciais. Os protocolos atuais são suficientes apenas para gerar organoides que imitam o cérebro fetal humano por volta do segundo trimestre de desenvolvimento, em termos de composição celular e molecular (Camp et al., 2015; Pasca et al., 2015; Qian et al., 2016). Outros desafios e limitações serão abordados posteriormente, incluindo a dificuldade de desenvolver uma rede de vascularização ao lado do organoide. Ainda há necessidade de melhorias adicionais para superar as limitações do uso desses organoides, tornando-os mais confiáveis.

Esta revisão fornece uma breve visão histórica do sistema nervoso central por meio de modelos organoides cerebrais, bem como uma visão geral de algumas das neuropatologias que têm sido estudadas usando esses modelos, destacando suas limitações, bem como hipóteses e estratégias que estão sendo desenvolvidas para superar os desafios da modelagem *in vitro*.

### 1.1 DESENVOLVIMENTO DA TECNOLOGIA ORGANOIDE:

As tentativas iniciais de criar modelos *in vitro* de doenças neurológicas foram baseadas no cultivo de células neurais em monocamadas (cultura 2D). As células neurais (neurônios e células gliais) foram obtidas por meio da diferenciação de células progenitoras neurais (NPCs), que por sua vez foram derivadas da diferenciação de iPSCs ou ESCs (Chambers et al., 2009). Tanto as iPSCs quanto as ESCs têm a capacidade de formar grandes agregados multicelulares, conhecidos como corpos embrióides, uma habilidade natural das ESCs. Esses corpos embrióides passam por um desenvolvimento semelhante ao de um embrião (Pettinato et al., 2015). Em 2001, um estudo usou ESCs para gerar corpos embrióides que foram posteriormente direcionados para uma linhagem neural, resultando em NPCs (Zhang et al., 2001). Os NPCs têm a capacidade de se auto-organizar em rosetas, um grupo de células progenitoras neurais polarizadas que podem formar estruturas semelhantes ao tubo neural embrionário (crítico para o desenvolvimento do neocórtex em embriões humanos) (Zhang et al., 2001; Shi et al., 2012).

A auto-organização é caracterizada pela capacidade de formar estruturas celulares específicas sem interferência externa, apenas por meio de processos intrínsecos e espontâneos. É um fator crucial

na formação de órgãos (Werner et al., 2017). Em 2003, um estudo demonstrou que as ESCs produziam precursores neurais mesmo na ausência de sinais indutivos, como fatores de crescimento. Posteriormente, foi demonstrado que algumas dessas células adquiriram identidade neural durante a diferenciação. É importante notar que apenas uma fração das CTEs foi capaz de adquirir identidade neural, necessitando do tratamento do restante com ácido retinóico, que é importante na diferenciação neural. O estudo também demonstrou que essa diferenciação restrita de células em NPCs não dependia da agregação multicelular (Ying et al., 2003). Assim, foram desenvolvidos protocolos para geração de neurônios corticais a partir de culturas 2D (Chambers et al., 2009). No entanto, conforme apresentado neste artigo, a cultura 2D de células neurais tem limitações na produção da conectividade observada in vivo. Os esforços para superar essas limitações levaram ao desenvolvimento de organoides cerebrais 3D capazes de representar modelos in vitro mais avançados, recapitulando com mais precisão as conectividades do cérebro humano, juntamente com sua alta complexidade.

Vale a pena notar que os pioneiros na criação do que hoje é conhecido como organoide cerebral foram um grupo de pesquisadores de células-tronco do laboratório de Yoshiki Sasai no Centro RIKEN de Biologia do Desenvolvimento no Japão. Esses pesquisadores lançaram as bases para a pesquisa que vem sendo conduzida desde então (Eiraku et al., 2008; Watanabe et al., 2005). Foi em 2011 que o grupo usou ESCs humanas em um sistema de cultura neural 3D para gerar estruturas auto-organizadas em forma de xícara que exibiam características semelhantes ao tecido da retina (Eiraku et al., 2011).

Outros trabalhos pioneiros avançaram no campo dos organoides cerebrais (Lancaster et al., 2013; Qian et al., 2016; Paşca et al., 2015; Lindborg et al., 2016). O trabalho de Qian e colegas demonstrou que estruturas cultivadas tridimensionalmente exibiam regiões corticais que exibiam uma organização semelhante à do córtex humano no desenvolvimento inicial, tanto estruturalmente quanto em termos de comportamento celular (Qian et al., 2016). Dentre vários estudos, novos protocolos foram desenvolvidos, como o cultivo de organoides utilizando corpos embrióides em matriz Matrigel cultivada em biorreator rotativo. Essa matriz foi destinada a servir de suporte para auxiliar na formação e expansão dos tecidos, enquanto o biorreator foi utilizado para facilitar as trocas de gases e nutrientes entre os organoides e o meio, resultando na produção de estruturas maiores e mais viáveis. Estes exibiram crescimento por períodos mais longos, mantendo a viabilidade por até 100 dias (Grebenyuk e Ranga, 2019; Lancaster et al., 2013; Qian et al., 2016). Vale ressaltar que novos modelos de biorreatores foram desenvolvidos com o objetivo de alcançar os subtipos neurais encontrados nas seis camadas corticais, adicionando ainda mais complexidade ao modelo (Qian et al., 2016). Tudo isso fez das tecnologias organoides um sistema modelo para o estudo do cérebro humano, seu desenvolvimento e doenças relacionadas.

Hoje, a produção de organoides pode ocorrer de duas maneiras: uma é denominada organoides cerebrais não padronizados ou inteiros e a outra, organoides cerebrais padronizados ou específicos da

região. Organoides não padronizados, normalmente cultivados em uma matriz extracelular, se auto-organizam em estruturas de diferentes regiões do cérebro por meio da atividade de pistas endógenas específicas da própria cultura de células (Lancaster et al., 2013; Renner et al., 2017). Os organoides padronizados visam gerar regiões específicas do cérebro adicionando fatores de crescimento externos específicos (Paşca et al., 2015; Qian et al., 2016). De fato, nos protocolos atuais, tanto os fatores de crescimento quanto os andaimes compostos por moléculas de matriz extracelular são de grande importância (Lancaster et al., 2013; Qian et al., 2016; Quadrato et al., 2017). Alguns protocolos são capazes de produzir esferoides cerebrais sem a presença de andaimes, apenas por meio de indução neural extrínseca. Esses esferoides sofrem neurogênese e astrogliogênese, replicando assim mais fielmente a diversidade de células neurais, um aspecto crítico do desenvolvimento cortical (Paşca et al., 2015).

Outro aspecto que deve ser considerado ao estudar o desenvolvimento da tecnologia organoide, que é crucial para a auto-organização, é a migração celular guiada. Esse processo é essencial para a montagem adequada do circuito neural funcional, impulsionado por fatores neurotróficos e interações intercelulares (Valiente e Marín, 2010). Como resultado da migração celular bem-sucedida, observamos a geração bem-sucedida de neurônios a partir de NPCs em seus respectivos locais originais, bem como seu redirecionamento para os locais esperados. Por exemplo, neurônios excitatórios migrando para a placa cortical simultaneamente com neurônios inibitórios, que também migram para se conectar com os neurônios excitatórios no córtex cerebral para modular a atividade neuronal (Kriegstein e Noctor, 2004). A marcação de fluorescência confirma a modelagem do processo de migração *in vitro* (Bagley et al., 2017).

Aproximando-se de uma década de história, os organoides cerebrais e a tecnologia associada já começaram a impactar fortemente a medicina moderna. Espera-se que este modelo se torne inestimável para uma melhor compreensão da biologia fundamental do desenvolvimento, função e distúrbios cerebrais.

## 1.2 LIMITES E ADIANTAMENTOS

A tecnologia de organoides, representada por sistemas de cultura tridimensionais (3D), é o mais recente desenvolvimento tecnológico na modelação do sistema nervoso central (SNC), abordando algumas das necessidades anteriormente não satisfeitas pela análise de tecidos *in vivo* ou pela utilização de culturas de células 2D. Desde a criação dessa tecnologia, muitos avanços foram feitos no desenvolvimento desses modelos, como a capacidade de recapitular marcos cada vez mais posteriores do desenvolvimento do cérebro e estender a capacidade de cultivo e manutenção desses organoides. O transplante *in vivo* é atualmente um assunto de discussão entre muitos pesquisadores. Este tópico ainda

está sujeito a considerações éticas e epistemológicas sobre o potencial desenvolvimento da consciência em organoides (Lavazza e Massimini, 2018; Pastor, 2018).

Embora os benefícios do uso de organoides cerebrais representem um sistema de cultura vantajoso em muitos aspectos, com uma incrível diversidade de células neurais que nos ajudam a modelar as interações intercelulares durante a organogênese o mais próximo possível, é importante notar que a tecnologia sofre de certas limitações, que estão constantemente sendo trazidas à atenção, servindo como ponto de partida para novas pesquisas voltadas para o aprimoramento (DiLullo e Kriegstein, 2017).

Em relação à reprodutibilidade, os protocolos de desenvolvimento de organoides podem resultar em lotes variáveis, apresentando diferenças nas composições de células que representam determinadas regiões cerebrais, resultando em variabilidades morfofuncionais (Lancaster e Knoblich, 2014b). Diferenças foram observadas ao comparar a mesma região entre dois organoides de lotes diferentes, e mesmo dentro do mesmo lote, em termos de distribuição, densidade e composição celular (Di Lullo e Kriegstein, 2017; Kelava e Lancaster, 2016a). Isso leva a diferentes identidades regionais nos organoides, o que, por sua vez, levanta preocupações significativas sobre a reprodutibilidade e precisão dos protocolos (Kelava e Lancaster, 2016a).

De fato, a variabilidade entre os modelos organoides pode ter sérias implicações quando usados para modelagem de doenças, testes de drogas ou estudos focados no desenvolvimento neurológico, pois a heterogeneidade implica inconsistência nos fenótipos analisados. Esse problema pode ser mitigado aumentando as repetições em análises quantitativas, mas isso aumentaria o custo dos experimentos. Por outro lado, análises qualitativas, como a morfologia por microscopia, por exemplo, ainda estariam comprometidas. Por esse motivo, conforme sugerido por Kelava e Lancaster, ao investigar fenótipos relacionados a doenças genéticas usando organoides, os resultados devem ser robustos o suficiente para serem considerados (Kelava e Lancaster, 2016b). Vale a pena notar que melhorias nos protocolos de geração de organoides estão sendo desenvolvidas para reduzir a heterogeneidade e otimizar a reprodutibilidade (Qian et al., 2016; Sloan et al., 2018; Yoon et al., 2019).

Um fator que limita o desenvolvimento de organoides em relação aos estágios iniciais da organogênese é a ausência ou presença mínima de subtipos celulares relevantes (Pasca et al., 2015; Qian et al., 2016). Vários tipos de células não neurais compõem o cérebro humano, e essas células não são necessariamente células neurais derivadas do neuroectoderma. Células não neurais, como microglia, células endoteliais, células hematopoiéticas, bem como meninges, estão amplamente ausentes em organoides porque a maioria dos protocolos atuais induz o destino neuroectodérmico no corpo embriônico. Consequentemente, as funções ou distúrbios cerebrais que se originam de células não neuronais ou de interações entre células não neuronais e células neurais não podem ser adequadamente modeladas em organoides cerebrais. Um estudo conduzido por Ormel e colegas,

usando uma concentração mais baixa de heparina (um estimulante neuroectoderma), retardando a transferência para o matrigel e não aplicando o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) no protocolo de diferenciação de organoides cerebrais, obteve células progenitoras mesodérmicas capazes de se diferenciar em micróglia madura. Os autores atribuíram isso ao microambiente do próprio organoide, que apresentava condições semelhantes ao SNC que permitiram o desenvolvimento dessas microglias. O monitoramento temporal do desenvolvimento organoide levou à observação de que as células mesodérmicas presentes no início originaram a microglia em estágios subsequentes. O grupo destacou que os fatores conhecidos por impulsionar o desenvolvimento microglial em roedores, como CSF1, IL34 e TGFβ1 (normalmente usados para gerar micróglia a partir de iPSCs), são os mesmos fatores expressos inerentemente pelos organoides cerebrais. Os resultados mostraram organoides com formação de sinapses funcionais e a detecção de ramificações microgliais muito próximas de processos neuronais e estruturas sinápticas (Ormel et al., 2018). Outros métodos de co-cultura de microglia diferenciada em 2D ou introdução dessas células em organoides cerebrais também podem ser usados na modelagem de doenças ou para investigar interações entre microglia e células neurais (Lin et al., 2018).

Toda essa preocupação decorre da necessidade crucial de entender se os organoides cerebrais recriam os circuitos neurais observados no cérebro humano (ou pelo menos possuem a diversidade celular necessária para tal e em proporção próxima ao ideal), permitindo-nos avançar na comparação e compreensão dos achados fisiopatológicos em organoides cerebrais humanos.

Outra questão relacionada à ausência de células mesodérmicas é a resultante falta de vascularização, o que representa um obstáculo significativo no desenvolvimento e manutenção dos organoides. O cérebro em desenvolvimento em estágio avançado é altamente dependente da vascularização para a difusão de nutrientes e oxigenação. Além disso, grupos de células neurais e vascularização estão entrelaçados na estrutura cerebral. Dado que os modelos organoides cerebrais não possuem um sistema circulatório inerente com vasos sanguíneos, eles dependem da simples difusão do meio de cultura para o fornecimento de gases e nutrientes. Quando cultivadas por longos períodos, um número significativo de células dentro dos organoides, particularmente em seu interior, sofre apoptose devido à deficiência de oxigênio e nutrientes (Lancaster e Knoblich, 2014a). A ausência de vascularização também interrompe certas pistas de padronização endógena necessárias para a diferenciação de progenitores neurais e o desenvolvimento adequado dos organoides. Essas pistas são extremamente importantes para o desenvolvimento em estágio final das estruturas neurais. Além disso, vale ressaltar que alguns dos nichos de células progenitoras neurais estão localizados perto de vasos sanguíneos.

Confrontado com essa questão, torna-se imperativo refinar os protocolos existentes, simulando o ambiente fisiológico, alterando as condições de cultivo e empregando a bioengenharia para fornecer

vascularização, estabelecendo assim um sistema de fluxo de nutrientes, bem como para promover o surgimento e preservação de pistas de padronização nos organoides (Kelava e Lancaster, 2016a).

Técnicas recentes de vascularização têm se mostrado promissoras para enfrentar esses desafios, demonstrando a geração de organoides de vasos sanguíneos a partir de CEPs humanas, contendo células endoteliais que têm a capacidade de se auto-montar, formando redes capilares. Após o transplante desses organoides em camundongos, foi relatada a formação de um sistema vascular bem definido (Cakir et al. 2019, Mansour et al. 2018, Pham et al. 2018, Wimmwe et al. 2019).

Sabe-se que o suprimento sanguíneo adequado é essencial para o funcionamento normal do cérebro, e uma falha na rede vascular cerebral pode resultar em danos e perda de função nos tecidos cerebrais. A rede vascular cerebral é composta pela barreira hematoencefálica (BHE), que protege o tecido de infecções, regula a passagem de nutrientes e remove resíduos metabólicos (Zhao et al., 2015). Além da BHE, podemos destacar algumas funções indispensáveis que as células gliais - particularmente a microglia e os astrócitos - desempenham no SNC em condições normais. A microglia serve como monitor imunológico do cérebro e, quando ativada, libera citocinas inflamatórias e desempenha funções fagocíticas (Solito & Sastre, 2012). Os astrócitos, por outro lado, estão envolvidos, entre outras coisas, na secreção de fatores de crescimento e na regulação do estresse oxidativo, bem como na remodelação sináptica, fornecimento de energia e homeostase (Wyss-Coray & Rogers, 2011). Ambos os tipos de células estão envolvidos no reparo, manutenção e permeabilidade da barreira hematoencefálica (BBB) (Abbott et al., 2006). Dada a complexidade dos mecanismos biológicos relacionados à fisiopatologia dos diversos distúrbios que afetam o SNC (muitos dos quais já são reprodutíveis por meio de técnicas de cultura organoide, como será visto a seguir), é importante enfatizar que pesquisas futuras com o objetivo de modelar tais distúrbios *in vitro* não devem se concentrar apenas na produção de tipos de células, como neurônios e glia, dentro dos modelos, mas também na contribuição dessas células associadas ao sistema vascular cerebral para entender o aparecimento e a progressão das patologias.

Atualmente, existem vários métodos para gerar vascularização em modelos organoides. Pham et al. (2018) geraram vascularização em organoides cerebrais incorporando-os em gotículas de Matrigel contendo células endoteliais previamente derivadas de iPSCs. Mansour et al. (2018) também alcançaram a vascularização enxertando organoides cerebrais desenvolvidos *in vitro* em córtices murinos *in vivo*. Este trabalho demonstrou o potencial dos organoides, pois observou a estrutura vascular e as conexões sinápticas entre o organoide e o SNC do hospedeiro, além de facilitar o estudo dos processos de vascularização e enxertia em geral (Mansour et al., 2018).

Como mencionado anteriormente, além da formação de vasos sanguíneos, outro componente importante que deve ser enfatizado e desenvolvido juntamente com a vascularização é a barreira hematoencefálica (BHE). Presente em todos os níveis da árvore vascular e formada por uma

monocamada contínua de endotélio circundada por células murais, a BHE restringe o transporte endotelial da maioria das moléculas (especialmente macromoléculas) do sangue, bem como a entrada de células sanguíneas (como leucócitos) e patógenos microbianos, mantendo assim a integridade do tecido cerebral (Zhao et al., 2015). Alguns grupos não abordaram a ausência ou presença da BHE ao gerar organoides vascularizados, enquanto outros já desenvolveram modelos viáveis de BHE, incluindo a presença de um a três tipos de células (Cho et al. 2015, Helms et al. 2016, Mansour et al. 2018, Pham et al. 2018, Wang et al. 2016). Semelhante aos modelos organoides, espera-se um desempenho aprimorado ao fornecer ao modelo maior complexidade celular. Assim, pode-se considerar a importância do desenvolvimento de modelos de BHE in vitro. Esses modelos podem ser utilizados para testar novos fármacos e abordagens terapêuticas relacionadas ao tratamento de doenças neurológicas, fornecendo dados mais específicos sobre a capacidade das moléculas utilizadas de atravessar a BHE e suas ações subsequentes, como citotoxicidade glial e neural. Outro aspecto importante é proporcionar uma melhor compreensão das interações entre a BHE e o tecido cerebral adjacente (Nzou et al., 2018). Em resumo, esses modelos representam uma promessa para a modelagem in vitro de condições e lesões neurodegenerativas, como esclerose lateral amiotrófica, doença de Alzheimer e acidente vascular cerebral.

Portanto, os organoides têm se mostrado promissores para investigar doenças relacionadas ao neurodesenvolvimento, também com enorme potencial para testar medicamentos personalizados para certos distúrbios cerebrais. Nas seções seguintes, os principais distúrbios relacionados ao desenvolvimento neurológico e à neurodegeneração serão brevemente apresentados, discutindo as principais abordagens e desafios relacionados ao estudo desses distúrbios. Mais tarde, o foco será o transtorno do espectro do autismo (TEA), a doença de Alzheimer, a produção de neuroglia e o desenvolvimento da rede vascular cerebral.

### 1.3 UTILIZAÇÃO DE ORGANOIDES CEREBRAIS NA MODELAGEM DE DISTÚRBIOS NEUROLÓGICOS: AVANÇOS E DESAFIOS

Por vários anos, os organoides cerebrais têm sido amplamente utilizados como meio de investigar distúrbios que afetam o cérebro humano. Devido à semelhança entre os estágios de desenvolvimento - especialmente na fase inicial - que ambos sofrem, os organoides têm, na maioria das vezes, sido considerados os modelos mais adequados para a investigação de distúrbios relacionados ao desenvolvimento neurológico. Além disso, na modelagem de distúrbios neurodegenerativos, os organoides são excelentes para preencher a lacuna entre pacientes e modelos animais. Outras utilidades, como modelar a progressão do câncer cerebral, juntamente com estudos para desenvolvimento de medicamentos, edição genômica e remodelação epigenômica, dão aos organoides

o status de um modelo experimental promissor para reproduzir e padronizar distúrbios cerebrais ((Bershteyn et al., 2017; Pacitti et al., 2019; Sachs et al., 2018; Sol & Ding, 2017; Yan et al., 2018).

De fato, desde a sua criação, os organoides têm sido objeto de um número exponencial de publicações. Pacitti e colegas (2019), em sua revisão, relatam a popularidade dos organoides ao longo dos anos. Como mencionado anteriormente, embora os modelos animais tenham sido extremamente importantes para nossa compreensão atual dos mecanismos patológicos de muitos distúrbios cerebrais, como a relação entre genes mutantes e fenótipo, esses modelos têm limitações em relação à tradução de suas descobertas para humanos. Uma dessas limitações é a composição celular diferente entre os organismos. Há casos em que fenótipos de doenças são encontrados tanto em modelos animais quanto em organoides, e tais casos são importantes para validar (ou não) ambos os modelos (Bershteyn et al., 2017). Além disso, os organoides podem fornecer conhecimento sobre fenótipos humanos específicos, bem como subpopulações celulares que não são facilmente observadas em outros mamíferos. Além disso, os organoides apresentam outras vantagens significativas, como a possibilidade de utilizá-los como modelos de tecidos vivos e estudar a funcionalidade celular ou a dinâmica comportamental de forma mais fácil e acessível (em comparação com os tecidos neurais *in vivo*). Em organoides, sinapses funcionais podem ser encontradas após 6 meses de cultura, bem como considerável maturação neuronal, com dendritos bem formados e redes neurais ativas após nove meses (Wang, 2018). A possibilidade de edição do genoma oferece uma criação mais precisa de mutações ou reparos, expandindo ainda mais a modelagem de muitas doenças (Sun & Ding, 2017). Como os organoides são uma tecnologia relativamente nova, mas mostrando rápida e significativa expansão como ferramentas de modelagem de doenças *in vitro*, esta seção desta revisão será dedicada aos avanços neste campo.

O que chamamos de transtornos do neurodesenvolvimento (NDDs) são todas as doenças que comprometem algumas funções cerebrais, como aprendizagem, sociabilidade e coordenação motora, e que se originam do comprometimento dos processos normais de desenvolvimento causados por algum tipo de distúrbio. Em outras palavras, eles são um grupo de distúrbios neurológicos de início precoce. As manifestações de doenças resultantes de anormalidades nos processos de desenvolvimento incluem distúrbios como epilepsia, microcefalia, deficiência intelectual e distúrbios de linguagem. Também estão incluídos transtornos como Transtorno do Espectro do Autismo (TEA), transtorno de déficit de atenção/hiperatividade (TDAH), esquizofrenia, transtorno bipolar, síndrome de Tourette, síndrome de Rett e transtorno do desenvolvimento da coordenação (Savatt & Myers, 2021). Diz-se que os NDDs afetam de 4 a 5% da população mundial (Mitchell, 2011) e podem ser atribuídos a mutações em mais de 1000 loci (Tărlungeanu & Novarino, 2018).

Atualmente, existem limitações quanto à compreensão da etiologia dos NDDs. Essas limitações vão desde o difícil delineamento dos componentes envolvidos na hereditariedade até a identificação dos mecanismos pelos quais fatores celulares específicos levam ao transtorno, incluindo a definição

desses fatores. O diagnóstico clínico desses distúrbios, muitas vezes um processo demorado e caro, ainda é limitado pela heterogeneidade na apresentação clínica que os pacientes apresentam (de la Torre-Ubieta et al., 2016). Portanto, a compreensão das causas dos NDDs, como a identificação de fatores de risco genéticos, bem como fatores ambientais, e o estabelecimento de um modelo pré-clínico adequado para o desenvolvimento de novos tratamentos, representam um passo importante para o desenvolvimento de abordagens terapêuticas personalizadas.

Modelos de NDDs em animais certamente têm sido essenciais para o entendimento atual dos mecanismos relacionados à patologia desses distúrbios. No entanto, existem diferenças entre um modelo humano e um modelo animal que limitam o uso deste último, incluindo características biológicas relacionadas ao desenvolvimento, composição celular e genética. Muitas doenças cognitivas e comportamentais têm origens poligênicas e influências ambientais multifatoriais, tornando desafiador o estudo de modelos de espécies evolutivamente diferentes, como roedores, no que diz respeito às suas habilidades intelectuais e comportamentais em comparação com a espécie humana. Portanto, há uma clara vantagem no uso de modelos *in vitro* para esses distúrbios (DiLullo e Kriegstein, 2017). Como vimos anteriormente, o uso de hESCs e iPSCs na geração de neurônios *in vitro* permitiu aos pesquisadores recapitular e reproduzir em laboratório vários defeitos sinápticos neuronais relacionados aos NDDs. Uma vantagem do uso de modelos baseados em células-tronco é a fidelidade de modelar doenças diretamente dos indivíduos afetados. Assim, o modelo *in vitro*, além de possuir a mesma informação genética do paciente, pode reproduzir com alto grau de confiabilidade os fenótipos celulares e moleculares associados à doença em questão. Outra vantagem é a geração de linhagens de células-tronco, o que implica uma fonte ilimitada de células. No entanto, esses métodos são limitados principalmente devido à baixa complexidade gerada pelos sistemas 2D, o que resulta em falta de conectividade de alta ordem, uma identidade imatura de neurônios diferenciados *in vitro* e alta heterogeneidade entre clones derivados de iPSCs (Sun & Ding, 2017). Essas limitações estão sendo superadas à medida que a tecnologia organoide ganha terreno. Mais tarde, veremos exemplos de como os organoides estão contribuindo como ferramentas adicionais para estudar os mecanismos subjacentes dos NDDs.

Atualmente, os protocolos utilizados para a produção de organoides relatam a presença de neurônios de todas as seis camadas corticais de forma temporalmente estruturada. Em outras palavras, a neurogênese cortical no organoide, relativa ao surgimento de subtipos de neurônios, parece respeitar o tempo e a sequência do desenvolvimento *in vivo* (embora não estejam dispostos da mesma forma que *in vivo*). A produção de células gliais radiais e progenitores intermediários também é relatada (Lancaster et al., 2013; Qian et al., 2016), bem como a produção de subpopulações de células humanas que estão ausentes no desenvolvimento de modelos animais, como ratos (Di Lullo & Kriegstein, 2017).

Uma preocupação em relação à validação de modelos organoides é o entendimento da reprodutibilidade dos tipos celulares, bem como sua diversidade celular em modelos *in vitro*. Isso levou os cientistas a traçar o perfil de genomas de células únicas durante o neurodesenvolvimento, tanto *in vivo* quanto *in vitro*. A investigação é realizada observando alterações relacionadas à diversidade celular e ao enriquecimento da expressão gênica ao comparar organoides em diferentes estágios de desenvolvimento (Quadrato et al., 2017). Outra preocupação é a compreensão da auto-organização, um fenômeno ainda não bem compreendido. Buscando destacar essa questão, estudos identificaram centros organizadores de diferentes estruturas semelhantes ao cérebro em organoides (Renner et al., 2017).

Há outra questão importante, o estabelecimento de circuitos neurais confiáveis, especialmente na região cortical. Apesar de poucos, alguns estudos demonstram a presença de junções sinápticas funcionais em organoides (Quadrato et al., 2017). Muitas doenças neurológicas manifestam seu fenótipo no pós-natal, como problemas na formação e refinamento de circuitos e poda sináptica. Considerando que a maturação desses processos pode levar anos para formar as redes neurais observadas *in vivo*, a capacidade dos organoides de retratar fielmente essas características complexas relacionadas ao desenvolvimento e maturação do cérebro humano é questionável.

Como visto anteriormente nesta revisão, a tecnologia organoide como modelo representa melhor os estágios iniciais do desenvolvimento neurológico. Assim, seu uso é mais vantajoso para modelar doenças neurológicas de início precoce durante os estágios fetais ou embrionários. De fato, a modelagem *in vitro* de distúrbios do neurodesenvolvimento é talvez atualmente a abordagem mais impactante no uso de organoides. Essa abordagem permite o estudo do início e progressão da doença durante o neurodesenvolvimento, possibilitando uma maior compreensão dos mecanismos patológicos subjacentes. Os organoides constituem um modelo versátil, pois seu uso permite a modelagem de doenças tanto por meio de fatores genéticos quanto mediados pelo ambiente. Novas técnicas, como o desenvolvimento de redes funcionais, prometem ampliar os estudos para entender os mecanismos intracelulares e as interações célula-célula com mais detalhes (Trujillo et al., 2018<sup>a</sup>). Abaixo estão alguns exemplos de distúrbios que são mais passíveis de modelagem *in vitro*.

#### 1.4 MICROCEFALIA

A microcefalia é uma condição caracterizada por um tamanho reduzido da cabeça e é acompanhada por deficiência intelectual e convulsões. Esta doença foi o primeiro distúrbio do neurodesenvolvimento a ser modelado usando organoides cerebrais. Lancaster e colegas (2013) geraram organoides microencefálicos derivados de iPSCs de um paciente com uma mutação em um gene relacionado à codificação da Proteína 2 Associada à Regulação da Quinase Dependente de Ciclina 5 (CDK5RAP2), conhecida como fator de risco genético para microcefalia. Foi demonstrada diferença

de tamanho entre os organoides microencefálicos e os do grupo controle. Como esperado, os organoides menores eram do paciente microencefálico, apresentando diferenciação neural prematura e proliferação reduzida em suas células progenitoras neurais (NPCs). Este estudo e seus resultados foram de suma importância para os modelos organoides, pois os indicaram como ferramentas úteis para modelar distúrbios cerebrais, apresentando-os como um meio de entender os mecanismos subjacentes do fenótipo observado nos pacientes (Lancaster et al., 2013).

### 1.5 INFECÇÃO PELO ZIKA VÍRUS

Algumas doenças neurológicas, incluindo a microcefalia, podem ser promovidas por fatores ambientais que comprometem o desenvolvimento normal do cérebro fetal. Um exemplo altamente estudado é a infecção viral durante a gravidez. Em 2016, o vírus Zika foi epidemiologicamente ligado à microcefalia congênita em filhos de mães infectadas durante a gravidez (Heymann et al., 2016). Devido à falta de evidências experimentais que confirmem a hipótese de causalidade em humanos, organoides cerebrais e cultura 2D de células progenitoras neurais foram elementos-chave na compreensão dos mecanismos e vias pelas quais o vírus induziu danos ao cérebro fetal. Ao expor organoides derivados de iPSC ao vírus Zika, descobriu-se que o vírus tem tropismo por NPCs, e a infecção resultou em redução do crescimento de organoides e diminuição do número de NPCs (Cugola et al., 2016; Garcez et al., 2016; Qian et al., 2016). As vias de sinalização celular durante a infecção também foram descobertas usando organoides por meio da análise do transcriptoma (Cugola et al., 2016; Watanabe et al., 2017). No entanto, considerando a limitação dos modelos em retratar a complexidade de um cérebro humano (composição celular, arquitetura tecidual, etc.), os dados não foram suficientes para uma compreensão completa do processo infeccioso. O uso de tecido primário, além de apresentar tropismo para NPCs, identificou infecção e vulnerabilidade em astrócitos e microglia (Retallack et al., 2016), ao contrário de pesquisas realizadas em organoides, que mostraram infecção ocasional nesses tipos celulares (provavelmente devido a uma sub-representação de astrócitos e microglia nos organoides). Retallack e colegas também usaram tecidos primários para demonstrar a vulnerabilidade dos astrócitos e células gliais radiais à infecção por meio do receptor AXL (um receptor de tirosina-proteína quinase abundante nesses tipos de células).

Esses exemplos, além de destacarem a utilidade dos organoides para a investigação da etiologia dos distúrbios do neurodesenvolvimento, também enfatizam a necessidade de aprimoramento constante nos protocolos de produção de organoides do cérebro humano para garantir melhor precisão nos resultados. Como apresentaremos mais adiante, novos protocolos com o objetivo de criar células gliais dentro de organoides podem resolver esse impasse.

## 1.6 MACROCEFALIA

Assim como a microcefalia, o fenótipo macroencefálico também é o resultado de algumas mutações. Nesse caso, o silenciamento do gene PTEN é o principal fator (Butler et al., 2005). O uso de hESCs nocaute PTEN para a produção de organoides cerebrais resultou em organoides com maior volume e área de superfície acompanhados por aumento de células neuroepiteliais, aumento da proliferação celular e diferenciação neuronal retardada (Li et al., 2017).

## 1.7 LISENCEFALIA CONGÊNITA OU SÍNDROME DE MILLER-DIEKER

A Síndrome de Miller-Dieker (SMD) é uma forma congênita de lisencefalia, um distúrbio do desenvolvimento neurológico caracterizado pela ausência de convoluções cerebrais normais, resultando em deficiência intelectual e convulsões (Blazejewski et al., 2018). Estudos conduzidos com a ajuda de organoides cerebrais identificaram mecanismos subjacentes ao fenótipo da síndrome. Iefremova e colegas (2017) desenvolveram organoides a partir de iPSCs de pacientes com SMD. Os organoides apresentaram tamanho reduzido e taxa de expansão mais lenta em comparação com os controles, além de outras modificações estruturais. Outro estudo também modelou a síndrome por meio de células de pacientes e observou uma desregulação da migração neuronal e do eixo mitótico das células gliais e neuroepiteliais (Bershteyn et al., 2017). Esses dados sugerem que os organoides podem recapitular importantes mecanismos celulares e moleculares na formação da doença.

## 1.8 DOENÇA DE SANDHOFF

A doença de Sandhoff é um distúrbio do neurodesenvolvimento caracterizado pelo acúmulo lisossômico de gangliosídeo GM2 e está relacionada a um defeito na enzima hexosaminidase devido a uma mutação no gene HEXB (Sandhoff et al., 1971). Além do atraso no desenvolvimento, os pacientes com essa doença apresentam macrocefalia e convulsões (Allende et al., 2018). Allende et al. (2018) produziram organoides cerebrais a partir de células de um paciente afetado e de iPSCs isogênicas com uma mutação HEXB gerada por CRISPR/Cas9. Os organoides derivados das células do paciente exibiram um aumento no tamanho do organoide paralelo ao aumento da proliferação celular em comparação com o controle.

## 1.9 SÍNDROME DE RETT

A Síndrome de Rett, um distúrbio do neurodesenvolvimento, é mais comumente causada por mutações que ocorrem no cromossomo X, no gene MECP2 que codifica a proteína 2 de ligação ao metil-CpG (uma proteína que se liga especificamente a sequências de DNA metiladas, com sua principal função sendo a repressão transcricional). Clinicamente, os sintomas variam de acordo com o sexo; as mulheres apresentam deficiências motoras e de linguagem, enquanto os homens sofrem de

encefalopatia congênita grave e geralmente têm uma morte prematura (Ip et al., 2018). Organoides cerebrais de pacientes com a síndrome foram fundamentais na identificação do papel de microRNAs super-regulados (miR-199 e miR-214) em importantes vias de sinalização para neurogênese e diferenciação neural. Os organoides de pacientes com síndrome de Rett exibiram uma área ventricular aumentada com diminuição da espessura da parede ventricular, bem como um aumento no número de progenitores neurais devido à proliferação exacerbada, levando ao aumento da densidade celular tipicamente observado em pacientes com a síndrome (Mellios et al., 2018).

### 1.10 SÍNDROME DE TIMÓTEO

Outro exemplo diz respeito à síndrome de Timothy (ST). É um distúrbio do neurodesenvolvimento caracterizado principalmente pela presença de neurônios inibitórios anormais. A síndrome é causada por uma mutação no gene *CACNA1C*, que codifica proteínas que compõem os canais de cálcio, especialmente o tipo L, relacionados à migração de interneurônios, regulando a frequência e o término da migração. Birey et al. (2017) foram responsáveis pelo primeiro estudo baseado em um sistema organoide fundido para investigar interações entre diferentes regiões do cérebro (assunto discutido posteriormente). Nesta síndrome, há um déficit na migração celular inter-regional GABAérgica do prosencéfalo ventral para o dorsal. Para reproduzir essa migração, organoides de diferentes regiões foram gerados a partir de iPSCs de pacientes e posteriormente fundidos. Os testes de marcadores fluorescentes revelaram que os neurônios inibitórios prejudicaram a migração tangencial. Quando um organoide de prosencéfalo ventral foi fundido com um organoide de prosencéfalo dorsal, ambos obtidos de células de pacientes com ST, o número de saltos necessários para a migração aumentou, pois a amplitude do salto foi significativamente reduzida em comparação com os organoides de controle.

### 1.11 ESQUIZOFRENIA

Os modelos 2D têm sido importantes para estudar os mecanismos subjacentes da esquizofrenia (Brennand et al., 2011). Essas descobertas estão sendo complementadas com estudos que usam modelos organoides cerebrais. Por exemplo, um estudo observou que em organoides derivados de pacientes com uma mutação no gene *DSC1*, houve um atraso na mitose. O gene em questão está associado à esquizofrenia e tem como uma de suas funções regular eventos mitóticos (Ye et al., 2017).

### 1.12 AUTISMO

O transtorno do espectro do autismo (TEA) é um distúrbio neurobiológico complexo do desenvolvimento comumente observado no início da vida de um indivíduo. É caracterizada principalmente por déficits neuropsicológicos e comportamentais, como comprometimento cognitivo

relacionado a dificuldades de comunicação social e presença de comportamentos repetitivos ou estereotipados. Para uma melhor compreensão das principais características encontradas em um paciente autista, consulte Mukherjee (2017). A hipótese mais provavelmente aceita para a causalidade do autismo é a interação ou conjunção de múltiplos fatores, como fatores genéticos, epigenéticos e ambientais (Fett-Conte et al., 2016). Vale ressaltar que uma das possíveis origens genéticas do TEA ocorre por meio de mutações em genes do cromossomo X, como o PTCHD1, responsável por aproximadamente 1% dos casos de TEA (Noor et al., 2010). Até certo ponto, esses fatores levam a um desequilíbrio de neurotransmissores, bem como a uma anormalidade relacionada à conectividade neuronal e à sinaptogênese, que, por sua vez, pode levar à disfunção das vias neuronais. Essas conexões anormais de regiões funcionais do cérebro podem refletir anormalidades morfológicas tipicamente encontradas em crianças autistas (Misic et al., 2014; Just et al., 2012), resultando em dificuldades de comunicação e aprendizagem (Verly et al., 2013) (Schipul et al., 2012). Anormalidades em relação ao tamanho do corpo caloso (He et al., 2010) também são descritas, bem como afinamento cortical nos lobos frontal, parietal e occipital (Zielinski et al., 2014) e uma redução na conectividade neural entre esses lobos (Tyszka et al., 2014). A poda sináptica irregular mediada por microglia em indivíduos autistas está relacionada à fraca transmissão sináptica e à diminuição da conectividade funcional do cérebro, o que, por sua vez, implica comportamento repetitivo e déficits na interação social (Zhan et al., 2014). Além desses fatores, distúrbios no eixo de comunicação intestino-cérebro (promovidos principalmente pela microbiota intestinal) (Sharon et al., 2016) podem contribuir para vários aspectos do cérebro autista.

Estudos baseados em sequenciamento de RNA indicam que uma grande parte das células encontradas em organoides tem um padrão de expressão gênica correspondente ao de um cérebro fetal humano (Ilieva et al., 2017). Isso dá um caráter muito promissor à pesquisa usando tecnologia organoide. Um estudo realizado por Mariani et al. (2015) utilizou organoides cerebrais produzidos com iPSCs derivadas de pacientes com TEA, que, quando comparados com um grupo controle, apresentaram: menor presença de neurites e sinapses; diferenças relacionadas à regulação do citoesqueleto; e deficiências na função do canal iônico de potássio. Esses organoides também apresentaram um ciclo celular acelerado e aumento da produção de interneurônios GABAérgicos inibitórios, características que podem ser encontradas em pacientes autistas. Uma análise do transcriptoma mostrou uma superexpressão do gene FOXP1, que foi positivamente correlacionada com a formação excessiva de neurônios inibitórios. Esse resultado foi validado por experimentos que promoveram o knockdown do gene FOXP1, o que reduziu a produção de GABA ao nível considerado normal (Mariani et al., 2015).

Aberrações no desenvolvimento em áreas que concentram um maior número de células-tronco neurais (NSCs) têm maior influência no processo de desenvolvimento geral. É o caso da zona

subventricular (ZVS). Os genes que regulam a proliferação, migração e diferenciação celular nesta área em questão são desregulados em pacientes autistas jovens. A pesquisa também sugere que pacientes autistas têm diferentes perfis de metilação do DNA em genes relacionados a essas características. Ilieva et al. (2017) observaram um acúmulo de metilação no cérebro em desenvolvimento de pacientes autistas, sugerindo regulação epigenética anormal (Ilieva et al., 2017). Estudos desse tipo usando organoides como modelo podem facilmente fornecer respostas sobre a regulação epigenética, uma vez que os organoides recapitulam a maioria das características epigenômicas do desenvolvimento do cérebro fetal.

Com o objetivo de investigar a interação entre neurônios e astrócitos e a conectividade neuronal em indivíduos com autismo, Russo et al. (2018) empregaram modelos iPSC derivados de pacientes com TEA não síndromicos cultivados junto com astrócitos em um modelo de cultura 2D (população neuronal cultivada em cima da população de astrócitos). Os resultados foram intrigantes, pois a cultura de células derivadas de TEA exibiu características da doença, como diminuição da liberação de neurotransmissores glutamatérgicos, bem como alterações na expressão de genes relacionados à formação sináptica. Consequentemente, esses fatores alteraram a taxa de disparo espontâneo. A co-cultura de neurônios saudáveis com astrócitos derivados de TEA revelou a interferência das células gliais no desenvolvimento neuronal (sinaptogênese e morfologia neuronal), resultando em neurônios exibindo características celulares relacionadas ao TEA. Por outro lado, quando a co-cultura combinou astrócitos saudáveis com neurônios derivados de TEA, os fenótipos "normais" relacionados à sinaptogênese e morfologia neuronal foram restaurados. A secreção de IL-6 pelas células gliais foi identificada como uma possível causa dos fenótipos, confirmada pelo bloqueio dos níveis de citocina. Essa influência já havia sido sugerida anteriormente em outras pesquisas, e este estudo confirma a relação (Russo et al., 2018). Este trabalho traz resultados promissores para a pesquisa do autismo usando a tecnologia iPSC. Os organoides cerebrais podem ser usados como modelos para expandir ainda mais essas descobertas e auxiliar no desenvolvimento de futuras estratégias terapêuticas, pois os modelos 3D permitem a recriação de um ambiente celular mais complexo (Dezonne et al., 2017).

## **2 ORGANOIDES COMO MODELOS DE ALZHEIMER E OUTROS DISTÚRBIOS NEURODEGENERATIVOS**

As doenças neurodegenerativas (DEs) são responsáveis pela perda progressiva da função cognitiva e/ou motora dos pacientes, sendo esses sintomas frequentemente associados à morte progressiva e irreversível dos neurônios, levando à perda das funções cerebrais. Mutações precursoras e alelos de risco comuns associados ao risco de desenvolvimento se sobrepõem em diferentes distúrbios neurodegenerativos. Além disso, algumas síndromes podem ter manifestações clínicas sobrepostas. Por exemplo, déficits cognitivos comuns na doença de Alzheimer (DA) também estão

presentes na demência vascular e na demência com corpos de Lewy (LBD). Outro exemplo é o comprometimento do sistema motor, comum à doença de Parkinson (DP), esclerose múltipla (EM), esclerose lateral amiotrófica (ELA), doença de Huntington (HD) e ataxias espinocerebelares (SCAs). Além disso, o envelhecimento é um fator de risco comum para algumas dessas doenças. Portanto, existe uma relação direta entre o aumento da expectativa de vida e o aumento da prevalência dessas doenças que se desenvolvem mais tarde na vida (Prince et al., 2013). Apesar da variedade de manifestações clínicas, as doenças neurodegenerativas compartilham mecanismos semelhantes. Uma característica é a agregação regional de proteínas citosólicas ou nucleares, como placas beta-amilóides (A $\beta$ ) na DA, agregados de proteínas poliglutamina na HD (e outras doenças semelhantes ligadas à repetição de nucleotídeos CAG - códon de glutamina) e agregados de alfa-sinucleína em sinucleinopatias como a DP (Taylor et al., 2002).

Conforme discutido anteriormente em relação aos NDDs, relações complexas genótipo-fenótipo também são encontradas nos NDs. Vários genes dão origem a entidades clínicas semelhantes em diferentes doenças. Quando identificados, esses genes ajudaram a elucidar as vias de doenças como DA e DP, sugerindo novas abordagens terapêuticas (Hardy & Orr, 2006). Por outro lado, um processo neurodegenerativo evocado por uma mutação pode causar um espectro de sinais clínicos (DeJesus-Hernandez et al., 2012; Renton et al., 2011; Schöls et al., 2015; Zimprich et al., 2004). Além disso, distúrbios com patologias sobrepostas tendem a compartilhar loci de risco genético (Zimprich et al., 2004; Scholz et al., 2009). Um exemplo são os genes compartilhados entre LBD e DA, entre os quais está o gene da apolipoproteína E (APOE), considerado o principal gene de risco para DA (Huang & Mahley, 2014; Guerreiro et al., 2018). Carregar um alelo polimórfico APOE $\epsilon$ 4 aumenta o risco do paciente (3 a 4 vezes) de desenvolver DA de início tardio; possuir dois alelos aumenta ainda mais esse risco (9 a 15 vezes). Além disso, o APOE $\epsilon$ 4 está associado ao início precoce da DA. Estudos indicam que o APOE4 está diretamente relacionado a fatores que prejudicam a função cerebral normal, como acúmulo de beta-amilóide e processos neurodegenerativos mediados por tau e alfa-sinucleína. Além disso, esse gene está ligado à neuroinflamação (devido ao seu papel significativo na regulação da resposta imune inata), degeneração sináptica, disfunção do metabolismo da glicose e disfunção cerebrovascular. Para um estudo mais aprofundado das implicações do gene APOE na DA e outras doenças neurodegenerativas, consulte (Yamazaki et al., 2019).

Algumas tauopatias também compartilham risco genético (Höglinger et al., 2011). As tauopatias são um grupo de NDs clinicamente heterogêneos cuja principal característica patológica é a formação de agregados da proteína tau formando emaranhados neurofibrilares dentro da célula. Também conhecida como "proteína tau associada a microtúbulos", essa proteína está relacionada à estabilidade dos microtúbulos. Entre as tauopatias mais conhecidas estão a DA, a paralisia supranuclear progressiva e a síndrome corticobasal (Orr et al., 2017). Mesmo nos casos em que

síndromes clinicamente diferentes são promovidas por variantes do mesmo gene, ainda pode haver uma sobreposição de riscos genéticos. Como mencionado anteriormente, muitas doenças neurológicas podem compartilhar mecanismos comuns. No entanto, a generalização não é possível porque ainda existem aspectos únicos de risco genético que promovem mecanismos diferentes para alguns DEs.

Apesar da extensa história, ainda não temos esclarecimentos completos sobre a patogênese da DA, mas marcadores conhecidos podem auxiliar na compreensão de sua patogênese (Forestier et al., 2015; Liu et al., 2015). Macroscopicamente, é possível observar atrofia do hipocampo e do córtex cerebral, que na DA está relacionada ao aumento da idade (DeTure & Dickson, 2019). Microscopicamente, pode-se observar a formação de placas amilóides e emaranhados neurofibrilares. Ambos os depósitos levam a extensa perda neuronal, embora sejam marcadores essenciais para a DA (Forestier et al., 2015; Liu et al., 2015; Stancu et al., 2014; Perl, 2010; DeTure & Dickson, 2019).

Especificamente, a DA é caracterizada pela deposição de peptídeos beta-amilóides (A $\beta$ ) no ambiente extracelular dos neurônios e pela formação de emaranhados neurofibrilares (NFTs) resultantes do acúmulo intracelular da proteína tau hiperfosforilada. A hipótese da cascata amiloide, formulada em 1992, postula que essas características constituem o principal evento patológico ligado ao quadro clínico da doença (Hardy & Higgins, 1992). A clivagem proteolítica da proteína precursora beta-amilóide (APP) pela ação de duas enzimas, beta-secretase 1 e gama-secretase, é o evento responsável pela produção de A $\beta$  (O'Brien & Wong, 2011). O acúmulo de A $\beta$  no cérebro pode levar, entre outras deficiências, à hiperfosforilação da proteína tau associada aos microtúbulos e, conseqüentemente, à formação de emaranhados neurofibrilares (Niedowicz et al., 2011).

O modelo organoide cerebral também é promissor no campo da modelagem ND, sendo considerado por muitos como uma alternativa aos modelos animais. Sabe-se que os modelos de roedores não são capazes de reproduzir a totalidade dos processos fisiopatológicos de doenças como DP e DA encontrados em humanos. Podemos tomar, por exemplo, alguns pontos citados por Dawson et al. (2018), a saber: diferenças inerentes aos métodos de geração de modelos animais como a superexpressão artificial de proteínas, que, quando contornadas, geram modelos que demonstram fenótipos leves da doença; a redução da "expectativa de vida" dos roedores, o que pode contribuir para o desenvolvimento incompleto de fenótipos patológicos de neurodegeneração; diferenças no desenvolvimento e função de cérebros de roedores e humanos, levando a erros ao comparar ou interpretar resultados de modelos e humanos; as diferenças genéticas entre ambos (Dawson et al., 2018). No entanto, respeitando as limitações dos organoides (principalmente aquelas relacionadas à imaturidade neuronal *in vitro*), eles têm sido apontados como ferramentas para investigar os estágios iniciais das doenças e seus processos mais comuns. Por exemplo, Raja et al. (2016) geraram organoides a partir de células de pacientes com DA, e os modelos apresentaram os dois biomarcadores da doença (deposição de A $\beta$  e hiperfosforilação da proteína tau). Esses resultados foram encorajadores porque os

modelos de cultura 2D não foram capazes de imitar o ambiente extracelular e sua complexidade necessária para observar esses biomarcadores (Wang, 2018). Além disso, foi demonstrada uma redução significativa desses biomarcadores em organoides após o tratamento com inibidores da  $\beta$  e da  $\gamma$  secretase (Raja et al., 2016).

Outro grupo de pesquisadores conseguiu desenvolver organoides que apresentavam acúmulo progressivo de  $A\beta$ , formando estruturas semelhantes a placas, precedendo o aparecimento de Tau fosforilada e emaranhados neurofibrilares (Gonzalez et al., 2018). Recentemente, com o objetivo de confirmar a hipótese de que organoides cerebrais anteriores formados por iPSCs de pacientes com DA podem recapitular com precisão o microambiente extracelular presente durante a degeneração neural, Yan et al. (2018b) geraram organoides corticais prosencéfalos com iPSCs com mutação no gene PSEN1 (responsável pela expressão da presenilina-1, que desempenha um papel importante na geração de  $A\beta$ ). Nos organoides, foram encontrados altos níveis de concentração de  $A\beta$ , fenótipos inflamatórios relacionados à DA (expressão gênica elevada de IL-6 e TNF- $\alpha$ ), aumento da expressão da proteína remodeladora da matriz (resultando em disfunção sináptica e perda de neurônios durante a patologia). O tratamento e as respostas à DAPT (um inibidor da  $\gamma$ -secretase), heparina e heparinase também foram avaliados. Os resultados do tratamento medicamentoso foram encorajadores, pois mostraram que o tratamento com DAPT inibiu a agregação endógena de  $A\beta$ , levando a uma diminuição da citotoxicidade, enquanto a heparina e a heparinase III foram capazes de reduzir as concentrações de  $A\beta$ , provavelmente dificultando a ligação dos peptídeos  $A\beta$  aos neurônios (Yan et al., 2018).

Exemplos do uso de organoides combinados com edição genômica por CRISPR/Cas9 também podem ser mencionados. Organoides com mutações no gene APOE geradas por edição genética mostraram um aumento nos biomarcadores para DA. Posteriormente, a patologia foi atenuada por edição posterior, convertendo APOE4 em APOE3 (Lin et al., 2018). Como os organoides cerebrais podem ser expostos a drogas, há esperança de que esses modelos sejam uma plataforma promissora para a descoberta de drogas para o tratamento de doenças neurodegenerativas.

Apesar do exposto, ainda não está claro o quão eficazes os organoides podem ser para modelar doenças neurodegenerativas. Como veremos mais adiante, novas técnicas e melhorias nos modelos prometem elevar os organoides cerebrais a um nível de protagonista para modelar até mesmo doenças de início tardio, como demências, DP e HD (Wang, 2018). O uso de células derivadas de pacientes com DP é promissor, pois estudos utilizando organoides específicos do tipo mesencefálico derivados de iPSCs para investigar a fisiopatologia e as bases genéticas da doença (Kim et al., 2019; Smits et al., 2019).

## 2.1 MODELAGEM DA EXPOSIÇÃO PRÉ-NATAL E PERINATAL A MEDICAMENTOS

Outra aplicabilidade dos organoides cerebrais que pode ou não estar associada à investigação de DEs é a exposição pré-natal a drogas ou substâncias, sejam elas lícitas ou ilícitas, para entender como e em que medida essas substâncias podem impactar a neurogênese. Estudos têm exposto organoides a diferentes tipos de substâncias (como cocaína, etanol, nicotina, por exemplo) para analisar as consequências dessa interação (Lee et al., 2016; Zhu et al., 2017; Wang et al., 2018). Outra abordagem para organoides além da exposição a drogas de abuso é a investigação dos efeitos neurotóxicos de várias substâncias, como ácido valpróico ou outros produtos químicos ambientais, como promotores de efeitos teratogênicos neurais (Schwartz et al., 2015; Belair et al., 2018). Em relação à cocaína, Lee et al. (2016) demonstraram a inibição da proliferação de NPCs neocorticais, diferenciação neuronal prematura e, conseqüentemente, interrupção do desenvolvimento do tecido neural após a exposição de organoides neocorticais à substância. A sugestão é que esses efeitos sejam mediados pela produção de espécies reativas de oxigênio, que podem ser um futuro alvo terapêutico.

## 2.2 MODELAGEM DO CÂNCER CEREBRAL

A natureza dos processos carcinogênicos os torna difíceis de curar, e um tratamento eficaz pode ser baseado em um sistema modelo que incorpora as características genéticas do paciente e reflete o complexo ambiente 3D dos tecidos tumorais. Os organoides cerebrais podem representar esse sistema na investigação da natureza progressiva do câncer, bem como de suas resistências, servindo como um bom modelo para testes de drogas. Organoides derivados de pacientes podem trazer abordagens mais personalizadas. Entre vários exemplos, o glioblastoma (o tipo mais comum e agressivo de tumor cerebral maligno que afeta humanos) tem sido o mais estudado. Esse tipo de modelo, denominado organoides tumorais cerebrais ou simplesmente organoides tumorais, foi produzido a partir de células tumorais de pacientes (obtidas diretamente do tecido neural com esse tipo de tumor) e enxertado em organoides cerebrais previamente preparados a partir de células-tronco embrionárias humanas (hESCs). O modelo 3D obtido é considerado superior ao ambiente 2D (mais comumente utilizado) por mimetizar melhor o microambiente e a progressão do câncer, além de apresentar resistência aos tratamentos quimioterápicos semelhantes ao tumor vivo em pacientes (Linkous et al., 2019). Os efeitos quimioterápicos são outro foco de estudo, e os efeitos das drogas "anticancerígenas" podem ser testados em organoides (Plummer et al., 2019). Outro método de geração de organoides tumorais é através do uso de CRISPR/Cas9 (Bian et al., 2018).

## 2.3 FUSÃO DE ORGANOIDES: ABORDAGENS PARA MODELAR CARACTERÍSTICAS COMPLEXAS

Levando em consideração as barreiras a serem superadas pela tecnologia organoide, principalmente suas limitações em reproduzir algumas características complexas do cérebro humano, como migração neuronal e conectividade sináptica, a técnica de fusão organoide traz novos horizontes e abordagens para o modelo. Como vimos, a auto-organização ocorre intrinsecamente em alguns protocolos de geração de organoides cerebrais, mas em muitos casos, essa auto-organização não leva a uma grande complexidade cerebral, principalmente devido à interrupção da migração neuronal e deficiência de conexão inter-regional. Modelos que imitam regiões específicas do cérebro têm maior reprodutibilidade (Birey et al., 2017). No entanto, modelos regionais criados separadamente não oferecem a oportunidade de recapitular processos como conectividade entre regiões e aqueles relacionados à migração celular (Lodato & Arlotta, 2015). Esses déficits levam a uma lacuna no estudo dos circuitos corticais. A fusão de organoides de regiões cerebrais pré-especificadas foi apresentada como uma solução (Birey et al., 2017). Um estudo, apresentado anteriormente nesta revisão, conduzido por Birey e colaboradores (2017) é um bom exemplo de fusão organoide para identificar déficits na migração interneuronal (GABAérgico, neste caso) em NDs (síndrome de Timothy, neste caso). A técnica utilizada baseia-se na co-cultura que promove a subsequente fusão de organoides de estruturas cerebrais distintas, neste caso, entre o cérebro anterior (excitatório) e ventral (inibitório). A fusão ocorre de forma simples: quando incorporados ao matrigel, os organoides são colocados o mais próximo possível, e o processo de fusão ocorre em aproximadamente uma semana (Bagley et al., 2017). Assim, esta técnica representa um método viável para modelar defeitos fenotípicos de distúrbios, como rotas migratórias e formações de circuitos corticais.

## 2.4 MODELOS NEUROVASCULARES

O processo de vascularização de organoides cerebrais é o próximo passo na pesquisa que visa reproduzir (ou parte dele) o cérebro humano *in vitro*. Como vimos, como os modelos não possuem vasos sanguíneos, seu crescimento e longevidade são bastante limitados. Até 2018, não estava claro se a co-cultura de organoides com células endoteliais poderia levar à formação de vasos, e mesmo se a presença desses vasos teria alguma implicação no desenvolvimento (processo de automontagem) do modelo (Pham et al., 2018). Para responder a essa pergunta, foi desenvolvido um protocolo para a vascularização de organoides cerebrais derivados de iPSCs com células endoteliais do mesmo paciente. A vascularização foi verificada, mostrando-se viável, pois não interferiu no desenvolvimento normal do organoide *in vitro* (automontagem e citoarquitetura). Os autores então transplantaram os organoides vascularizados gerados *in vitro* em roedores, bem como organoides de controle não vascularizados. Como resultado, os organoides vascularizados tiveram uma sobrevida maior em

comparação com os controles. Nesse sentido, os autores apresentaram a viabilidade da vascularização, principalmente temporalmente (Pham et al., 2018).

Vimos nesta revisão que os modelos *in vitro* da BHE são ferramentas indispensáveis para o estudo do desenvolvimento e transporte de fármacos para o SNC. A produção de organoides BBB desenvolvida até o momento, em grande parte por meio de co-cultura em ambientes de baixa adesão de organoides e células endoteliais, mostra que pericitos e astrócitos gerados mimetizam as principais propriedades da barreira, como a presença de junções apertadas e aderentes, glicoproteína P (P-gp) e transporte de moléculas ativas (Bergmann et al., 2018; Oliveira et al., 2019). Bergmann e colegas (2018) conseguiram criar organoides BBB como um modelo confiável para triagem de drogas *in vitro*.

Nzou et al. (2018) geraram um modelo organoide equipado com uma unidade neurovascular, que melhor imita o encontrado em humanos, contendo células neurovasculares, como células endoteliais microvasculares do cérebro humano, pericitos humanos e células neurais, como astrócitos humanos, microglia humana, oligodendrócitos humanos e neurônios humanos, em uma proporção de 30%, 15%, 15%, 5%, 15% e 20%, respectivamente. Nesse modelo, Nzou e colegas produziram pela primeira vez um organoide cerebral contendo astrócitos humanos, microglia humana, oligodendrócitos humanos e neurônios humanos. Células endoteliais microvasculares do cérebro humano e pericitos humanos foram então adicionados para revestir o organoide neuroglial, gerando assim um modelo organoide com células endoteliais ao redor das células do parênquima cerebral. Uma vez formado, o organoide resultante foi avaliado quanto às propriedades de permeabilidade da BHE, como a expressão de proteínas de junção apertada e aderente e proteínas transportadoras. Além disso, foram realizados ensaios para investigar a permeabilidade da BHE à IgG em organoides não tratados e em outros pré-tratados com histamina (um agente conhecido para a abertura transitória da BHE). Como resultado, a análise mostrou que os organoides de barreira eram mais seletivos aos anticorpos em comparação com os organoides de barreira não barreira, enquanto os organoides de barreira tratados com histamina mostraram maior permeabilidade em comparação com organoides de barreira não tratados. Outro achado foi relacionado à proteção contra componentes neurotóxicos, como o mercúrio, onde os organoides de barreira exibiram menor depleção celular em comparação com os organoides sem barreira.

Cakir e colegas (2019) desenvolveram um modelo organoide cortical totalmente vascularizado *in vitro*, um dos trabalhos mais recentes sobre o assunto. A equipe produziu organoides corticais a partir de hESCs induzidas expressando uma variante ectópica do fator de transcrição ETS humano (ETV2). A expressão desse fator de transcrição desempenhou um papel importante na reprogramação de fibroblastos humanos em células endoteliais. Os autores demonstraram ainda que a superexpressão de ETV2 induziu a diferenciação independente de VEGF. Após essa expressão gênica, alguns marcadores de vasculogênese foram observados, como genes relacionados à adesão celular. Assim, a

vascularização do organoide foi alcançada, e a presença de estruturas vasculares levou a uma melhor maturação funcional e sobrevivência (reduzindo os níveis de apoptose) das células organoides. O modelo também exibiu características semelhantes à BBB, incluindo aumento da expressão de junções apertadas, transportadores, como o transportador de glicose, e a presença de pericitos.

Apesar desses avanços, os modelos organoides vascularizados ainda não possuem uma rede vascular totalmente funcional em termos de suprimento de oxigênio e nutrientes (Oliveira et al., 2019). Como mencionado anteriormente, o enxerto in vivo de organoides cerebrais humanos em animais, especialmente em camundongos, tem sido desenvolvido como uma alternativa para obter organoides vascularizados para experimentos in vitro. Essa abordagem (realizada entre 30 e 50 dias após a criação do organoide) leva à vascularização progressiva do modelo por meio da invasão da vasculatura do hospedeiro, proporcionando fluxo sanguíneo; A viabilidade celular é maior em comparação com os organoides in vitro, além de apresentar maior maturação, diferenciação progressiva das células neuronais e gliais (incluindo interações microgliais registradas) e crescimento axonal, sugerindo integração funcional enxerto-hospedeiro (conforme registrado pela optogenética) (Mansour et al., 2018).

### **3 PERSPECTIVAS FUTURAS**

Com base em tudo o que foi discutido acima sobre a evolução da tecnologia organoide, é notável a rapidez com que ela evoluiu nos últimos anos, fornecendo-nos uma grande variedade de modelos 3D in vitro do cérebro humano para diversas aplicações, mostrando que a tecnologia é uma grande aliada na medicina. Ainda há muito a ser feito quando se busca a modelagem do neurodesenvolvimento humano in vitro. Os organoides cerebrais ainda carecem de algumas pistas de desenvolvimento e padronização que permitiriam uma organização semelhante a in vivo não presente in vitro, como a falta de tecido de suporte (Lancaster et al., 2013; Lancaster et al., 2014b; Kelava & Lancaster, 2016a).

Variações dentro de um mesmo lote ("efeito de batelada") são um dos primeiros desafios a serem superados para a reprodutibilidade de experimentos com organoides. Uma vez que as células tipicamente utilizadas para geração de organoides (iPSCs) possuem um certo grau de variabilidade entre si, uma possível solução seria o uso de linhagens selecionadas e métodos padronizados de geração de iPSCs em protocolos de geração de organoides, o que beneficiaria toda a comunidade científica em pesquisas futuras (Kelava e Lancaster, 2016a). Ainda dentro desse tema, técnicas de bioengenharia, como o desenvolvimento de scaffolds e matrizes extracelulares, podem ser úteis no prolongamento da viabilidade e desenvolvimento de organoides, fornecendo ferramentas que introduzem complexidade aos modelos, influenciam a arquitetura do tecido e mantêm a auto-organização dos organoides (Yin et al., 2016).

Outro ponto importante é o aprimoramento de protocolos visando ampliar a diversidade celular em organoides, crucial para o estudo das complexas interações que ocorrem no cérebro, como as interações neurônio-glia. Como visto nesta revisão, a presença de células gliais dentro dos organoides é essencial, pois são constituintes do sistema nervoso e desempenham papéis importantes: astrócitos, oligodendrócitos e microglia atuam na sinaptogênese, maturação do circuito, mielinização e homeostase, além de estarem envolvidos em estágios de doenças neurológicas. Ainda existem dificuldades na geração espontânea dessas células gliais, mas a pesquisa realizada por Ormel et al. (2018), onde a microglia foi gerada dentro de organoides, simboliza a janela de oportunidade para o avanço nessa área. Uma alternativa para modificar protocolos de geração de organoides é a adição de células gliais previamente diferenciadas de iPSCs ao modelo (Muffat et al., 2016).

No entanto, devemos lembrar que existem prós e contras em relação ao grau de complexidade estrutural dos organoides cerebrais, pois o alto grau de diversidade celular, que por um lado pode reproduzir com alguma fidelidade as complexas redes de comunicação intercelular, também pode adicionar dificuldades analíticas quando o objetivo da pesquisa é testar hipóteses relacionadas à contribuição de tipos celulares específicos para processos intercelulares específicos. A complementação dos resultados observados a partir de um modelo 3D, combinada com os resultados obtidos por meio da cultura 2D (que possui estrutura e ambiente mais homogêneos) de células específicas relacionadas a processos específicos, facilitará a compreensão inicial dos mecanismos associados aos distúrbios neurológicos, permitindo a comparação de dados referentes à interação celular e mecanismos moleculares intrínsecos.

Quando combinadas com outras abordagens em biologia celular e molecular, como a análise do genoma completo usando sequenciamento de célula única, as técnicas de geração de organoides podem abrir portas para investigarmos a diversidade celular generalizada em vários estágios do desenvolvimento do SNC, incluindo seus estágios posteriores ou mesmo durante o envelhecimento, bem como para investigar a etiologia de doenças neurológicas a partir de seus mecanismos moleculares (Camp et al., 2015; Quadrato et al., 2017). A genética relacionada à etiologia das doenças neurológicas é bastante heterogênea, por esse motivo, técnicas que definam de forma mais eficiente os diferentes impactos das variantes genéticas no neurodesenvolvimento são indispensáveis. A tecnologia atual de edição genética é uma aliada, pois tem a capacidade de modificar uma variedade de genes com alguma segurança, permitindo o silenciamento gênico e a indução de outros, principalmente em iPSCs (Ilieva et al., 2017). Novas técnicas de engenharia genética, como o sistema CRISPR/Cas9, nos forneceram manipulação do genoma e expandiram horizontes na pesquisa in vitro (Waddington et al., 2016). Essas técnicas permitiram que mutações fossem induzidas ou corrigidas em células do tipo selvagem ou derivadas de pacientes (Trujillo & Muotri, 2018b; Adams et al., 2019), e os organoides, por sua vez, mostraram adaptabilidade a essas técnicas (Yin et al., 2016). O processo de desenvolvimento do

cérebro humano também pode ser influenciado por mecanismos epigenéticos: uma perspectiva não abordada nesta revisão. Nesse sentido, os organoides podem ser usados como modelo para avaliar a remodelação epigenômica que ocorre durante o neurodesenvolvimento in vivo (Luo et al., 2016).

Como vimos nas seções anteriores, além do fornecimento de oxigênio e outros nutrientes, a vascularização está intimamente relacionada à maturação cerebral devido ao seu papel na diferenciação celular de NPCs. Modificações nos métodos de produção e cultura de organoides usando abordagens de bioengenharia são ferramentas essenciais nesse sentido. Os exemplos mencionados acima demonstram que a combinação de células endoteliais na cultura organoide para promover a vascularização in vivo tem sido um avanço significativo nos protocolos de geração de organoides cerebrais. A pesquisa sobre fenótipos vasculares em distúrbios do neurodesenvolvimento e neurodegenerativos também representa uma área indispensável para estudos futuros, pois a vasculatura cerebral está envolvida em múltiplos processos patogênicos que comprometem a cognição durante essas patologias. Além disso, ao analisar as técnicas de implantação de organoides em tecido animal, é possível investigar processos de vascularização para compreensão do reparo tecidual, aprimoramento das técnicas de transplante, compreensão dos mecanismos carcinogênicos, entre outros. Pesquisas de revisão futuras devem se concentrar nesses tópicos e integrar os dados disponíveis na literatura para uma melhor discussão.

Devido ao fato de que os organoides cerebrais mantêm as principais características de um cérebro em desenvolvimento com informações genéticas idênticas às dos pacientes (Sachs et al., 2018; Yan et al., 2018), dois outros campos de grande interesse são a medicina personalizada e a farmacologia. Esses campos podem se beneficiar da produção de organoides personalizados, ou seja, modelos derivados de pacientes, que visam reproduzir fielmente os mecanismos celulares e moleculares de um indivíduo associados a processos fisiológicos, patogênese e respostas terapêuticas. Essa abordagem é essencial para investigar futuros métodos prognósticos, bem como tratamentos personalizados.

Em geral, futuras abordagens de bioengenharia ainda são necessárias para favorecer métodos mais avançados para gerar organoides cerebrais. Devido ao enorme potencial dessa tecnologia, os biobancos constituídos por uma coleção de organoides modelo representando diferentes patologias relacionadas ao SNC facilitarão muito a pesquisa e, conseqüentemente, uma melhor compreensão dos distúrbios cerebrais, além de servirem de base para abordagens terapêuticas, como mencionado anteriormente. Podemos fazer uma comparação com biobancos de tipos de organoides tumorais, que, com suas coleções estabelecidas, demonstram os benefícios da implementação de biobancos de organoides; Dentre esses benefícios, destaca-se o desenvolvimento de testes terapêuticos para terapias de precisão. Se compararmos a dificuldade de obter tecido neural em oposição ao tecido tumoral, os biobancos organoides cerebrais provariam ser um recurso valioso (Sachs et al., 2018; Yan et al., 2018).



A reconhecida capacidade de auto-organização, diferenciação e geração de regiões e estruturas cerebrais com certo grau de complexidade torna os organoides modelos *in vitro* ideais e, em certa medida, necessários para o estudo do desenvolvimento do SNC. Eles se mostraram muito promissores para o campo da modelagem de distúrbios do neurodesenvolvimento. Uma vez superados os obstáculos técnicos e éticos, os futuros organoides servirão como modelos confiáveis, pois possuem um microambiente e diversidade celular mais próximos do que é observado *in vivo*, impactando fortemente a modelagem de doenças e os testes de triagem de medicamentos. Nesta revisão, fornecemos uma breve história da tecnologia e por que ela está revolucionando a maneira como estudamos o cérebro humano. É importante lembrar que ainda não é um modelo perfeito, pois ainda enfrentamos algumas limitações e, sem dúvida, outras surgirão no futuro.



## REFERÊNCIAS

1. Abbott, N. J., Rönnbäck, L., & Hansson, E. (2006). Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *\*Nature Reviews Neuroscience*, 7\*(1), 41–53. <http://dx.doi.org/10.1038/nrn1824>
2. Adams, J. W., Cugola, F. R., & Muotri, A. R. (2019). Brain organoids as tools for modeling human neurodevelopmental disorders. *\*Physiology*, 34\*(5), 365-375.
3. Agostinho, P., Cunha, R. A., & Oliveira, C. (2010). Neuroinflammation, oxidative stress and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *\*Current Pharmaceutical Design*, 16\*(25), 2766–2778. <http://dx.doi.org/10.2174/138161210793176572>
4. Allende, M. L., Cook, E. K., Larman, B. C., Nugent, A., Brady, J. M., Golebiowski, D., Sena-Esteves, M., Tifft, C. J., & Proia, R. L. (2018). Cerebral organoids derived from Sandhoff disease-induced pluripotent stem cells exhibit impaired neurodifferentiation. *\*Journal of Lipid Research*, 59\*(3), 550–563. <https://doi.org/10.1194/jlr.M081323>
5. Alstadhaug, K. B. (2014). Histamine in migraine and brain. *\*Headache*, 54\*, 246–259.
6. Auger, F. A., Gibot, L., & Lacroix, D. (2013). The pivotal role of vascularization in tissue engineering. *\*Annual Review of Biomedical Engineering*, 15\*, 177–200. <https://doi.org/10.1146/annurevbioeng-071812-152428>
7. Bagley, J. A., Reumann, D., Bian, S., Lévi-Strauss, J., & Knoblich, J. A. (2017). Fused cerebral organoids model interactions between brain regions. *\*Nature Methods*, 14\*(7), 743–751. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4304>
8. Barbierato, M., Facci, L., Argentini, C., Marinelli, C., Skaper, S. D., & Giusti, P. (2013). Astrocyte-microglia cooperation in the expression of a pro-inflammatory phenotype. *\*CNS Neurological Disorders – Drug Targets*, 12\*(5), 608–618.
9. Belair, D. G., Wood, C., Wolf, C. J., Abbott, B. D., Becker, C., & Moorefield, S. D. (2018). A three-dimensional organoid culture model to assess the influence of chemicals on morphogenetic fusion. *\*Toxicological Sciences*, 166\*, 394–408. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfy207>
10. Bell, R. D., Winkler, E. A., Singh, I., et al. (2012). Apolipoprotein E controls cerebrovascular integrity via cyclophilin A. *\*Nature*, 485\*, 512–516.
11. Bennett, R. E., Robbins, A. B., Hu, M., Cao, X., Betensky, R. A., Clark, T., et al. (2018). Tau induces blood vessel abnormalities and angiogenesis-related gene expression in P301L transgenic mice and human Alzheimer's disease. *\*Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 115\*(6), E1289–E1298.
12. Benzing, W. C., Wujek, J. R., Ward, E. K., Shaffer, D., Ashe, K. H., Younkin, S. G., & Brunden, K. R. (1999). Evidence for glial-mediated inflammation in aged APP(SW) transgenic mice. *\*Neurobiology of Aging*, 20\*(6), 581–589. [http://dx.doi.org/10.1016/S0197-4580\(99\)00065-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0197-4580(99)00065-2)
13. Bergmann, S., Lawler, S. E., Qu, Y., et al. (2018). Blood–brain-barrier organoids for investigating the permeability of CNS therapeutics. *\*Nature Protocols*, 13\*, 2827–2843. <https://doi.org/10.1038/s41596-018-0066-x>



14. Bernier, R., Golzio, C., Xiong, B., Stressman, H. A., Coe, B. P., Osnat, P., Kali, W., Jennifer, G., Carl, B., Anneke, T. V., et al. (2014). Disruptive CHD8 mutations define a subtype of autism early in development. *\*Cell\**. Available at: <http://www.sciencedaily.com/releases/2014/07/140703125851.htm>
15. Bershteyn, M., et al. (2017). Human iPSC-derived cerebral organoids model cellular features of lissencephaly and reveal prolonged mitosis of outer radial glia. *\*Cell Stem Cell, 20\*(4), 435–449.e4*.
16. Bhat, S., Acharya, U. R., Adeli, H., Bairy, G. M., & Adeli, A. (2014). Autism: Cause factors, early diagnosis, and therapies. *\*Reviews in the Neurosciences, 25\*(6), 841-850*.
17. Bian, S., Repic, M., Guo, Z., Kavirayani, A., Burkard, T., Bagley, J. A., Krauditsch, C., & Knoblich, J. A. (2018). Genetically engineered cerebral organoids model brain tumor formation. *\*Nature Methods, 15\**, 631-639.
18. Birey, F., et al. (2017). Assembly of functionally integrated human forebrain spheroids. *\*Nature, 545\**, 54–59.
19. Blazejewski, S. M., Bennison, S. A., Smith, T. H., & Toyo-Oka, K. (2018). Neurodevelopmental genetic diseases associated with microdeletions and microduplications of chromosome 17p13.3. *\*Frontiers in Genetics, 9\**, 80. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00080>
20. Blumberg, H. P., Wang, F., Chepenik, L. G., Kalmar, J. H., Edmiston, E., et al. (2008). Influence of vascular endothelial growth factor variation on human hippocampus morphology. *\*Biological Psychiatry, 64\**, 901–903.
21. Braak, H., & Braak, E. (1991). Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *\*Acta Neuropathologica, 82\*(4), 239–259*. <https://doi.org/10.1007/bf00308809>
22. Brammer, M. (2009). The role of neuroimaging in diagnosis and personalized medicine—current position and likely future directions. *\*Dialogues in Clinical Neuroscience, 11\**, 389–396.
23. Bras, J., et al. (2014). Genetic analysis implicates APOE, SNCA and suggests lysosomal dysfunction in the etiology of dementia with Lewy bodies. *\*Human Molecular Genetics, 23\**, 6139–6146.
24. Brennand, K. J., et al. (2011). Modelling schizophrenia using human induced pluripotent stem cells. *\*Nature, 473\**, 221–225.
25. Buée, L., Hof, P. R., Bouras, C., Delacourte, A., Perl, D. P., Morrison, J. H., et al. (1994). Pathological alterations of the cerebral microvasculature in Alzheimer's disease and related dementing disorders. *\*Acta Neuropathologica, 87\*(5), 469–480*.
26. Burroni, L., Orsi, A., Monti, L., Hayek, Y., Rocchi, R., & Vattimo, A. G. (2008). Regional cerebral blood flow in childhood autism: A SPET study with SPM evaluation. *\*Nuclear Medicine Communications, 29\**, 150–156.
27. Butler, M. G., Dasouki, M. J., Zhou, X. P., Talebizadeh, Z., Brown, M., Takahashi, T. N., Miles, J. H., Wang, C. H., Stratton, R., Pilarski, R., & Eng, C. (2005). Subset of individuals with autism spectrum disorders and extreme macrocephaly associated with germline PTEN tumor suppressor gene mutations. *\*Journal of Medical Genetics, 42\**, 318–321. <https://doi.org/10.1136/jmg.2004.024646>

28. Cabezas-Opazo, F. A., Vergara-Pulgar, K., Pérez, M. J., Jara, C., Osorio-Fuentealba, C., & Quintanilla, R. A. (2015). Mitochondrial dysfunction contributes to the pathogenesis of Alzheimer's Disease. *\*Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015\*, 509654.
29. Cahoy, J. D., Emery, B., Kaushal, A., Foo, L. C., Zamanian, J. L., Christopherson, K. S., et al. (2008). A transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: A new resource for understanding brain development and function. *\*Journal of Neuroscience*, 28\*, 264–278. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4178-07.2008>
30. Cakir, B., Xiang, Y., Tanaka, Y., et al. (2019). Engineering of human brain organoids with a functional vascular-like system. *\*Nature Methods*, 16\*, 1169–1175. <https://doi.org/10.1038/s41592-019-0586-5>
31. Camp, J. G., Badsha, F., Florio, M., Kanton, S., Gerber, T., Wilsch-Bräuninger, M., Lewitus, E., Sykes, A., Hevers, W., Lancaster, M., et al. (2015). Human cerebral organoids recapitulate gene expression programs of fetal neocortex development. *\*Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 112\*, 15672-15677.
32. Chailangkarn, T., Trujillo, C. A., Freitas, B. C., Hrvoj-Mihic, B., Herai, R. H., Yu, D. X., Brown, T. T., Marchetto, M. C., Bardy, C., McHenry, L., et al. (2016). A human neurodevelopmental model for Williams syndrome. *\*Nature*, 536\*, 338-343.
33. Chambers, S. M., Fasano, C. A., Papapetrou, E. P., Tomishima, M., Sadelain, M., & Studer, L. (2009). Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling. *\*Nature Biotechnology*, 27\*, 275–280.
34. Chang, D., et al. (2017). A meta-analysis of genome-wide association studies identifies 17 new Parkinson's disease risk loci. *\*Nature Genetics*, 49\*, 1511–1516.
35. Chauhan, A., Chauhan, V., Brown, W. T., & Cohen, I. (2004). Oxidative stress in autism: Increased antioxidant proteins. *\*Life Sciences*, 75\*(a), 2539-2549.
36. Chen, S. W., Zhong, X. S., Jiang, L. N., et al. (2016). Maternal autoimmune diseases and the risk of autism spectrum disorders in offspring: A systematic review and meta-analysis. *\*Behavioral Brain Research*, 296\*, 61–69.
37. Chez, M. G., Dowling, T., Patel, P. B., Khanna, P., & Kominsky, M. (2007). Elevation of tumor necrosis factor-alpha in cerebrospinal fluid of autistic children. *\*Pediatric Neurology*, 36\*, 361–365.
38. Ching, M. S., Shen, Y., Tan, W. H., Jeste, S. S., Morrow, E. M., Chen, X., et al. (2010). Deletions of NRXN1 (neurexin-1) predispose to a wide spectrum of developmental disorders. *\*American Journal of Medical Genetics*, 153B\*, 937–947.
39. Cho, H., et al. (2015). Three-dimensional blood-brain barrier model for in vitro studies of neurovascular pathology. *\*Scientific Reports*, 5\*.
40. Cho, S. H., et al. (2015). SIRT1 deficiency in microglia contributes to cognitive decline in aging and neurodegeneration via epigenetic regulation of IL-1 $\beta$ . *\*Journal of Neuroscience*, 35\*, 807–818.
41. Chung, W., Choi, S. Y., Lee, E., Park, H., Kang, J., Choi, Y., et al. (2015). Social deficits in IRSp53 mutant mice improved by NMDAR and mGluR5 suppression. *\*Nature Neuroscience*, 18\*, 435–443. <https://doi.org/10.1038/nn.3927>



42. Clarke, L. E., & Barres, B. A. (2013). Emerging roles of astrocytes in neural circuit development. \*Nature Reviews Neuroscience, 14\*, 311–321. <https://doi.org/10.1038/nrn3484>
43. Cribbs, D. H., et al. (2012). Extensive innate immune gene activation accompanies brain aging, increasing vulnerability to cognitive decline and neurodegeneration: A microarray study. \*Journal of Neuroinflammation, 9\*, 179.
44. Crotti, A., et al. (2014). Mutant Huntingtin promotes autonomous microglia activation via myeloid lineage-determining factors. \*Nature Neuroscience, 17\*, 513–521.
45. Cruz, D. (2012). 2D and 3D QSAR studies for aminoimidazoles, aminohidantoinos and aminopyridines derivatives with inhibitory activity about human beta-secretase enzyme. Dissertation, State University of Feira de Santana: Bahia.
46. Cugola, F. R., et al. (2016). The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. \*Nature, 534\*, 267–271.
47. Cunningham, C., Wilcockson, D. C., Campion, S., Lunnon, K., & Perry, V. H. (2005). Central and systemic endotoxin challenges exacerbate the local inflammatory response and increase neuronal death during chronic neurodegeneration. \*Journal of Neuroscience, 25\*(40), 9275–9284. <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2614-05.2005>
48. Dammann, O., & Leviton, A. (2004). Inflammatory brain damage in preterm newborns - dry numbers, wet lab, and causal inferences. \*Early Human Development, 79\*, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2004.04.009>
49. Dawson, G. (2008). Early behavioral intervention, brain plasticity, and the prevention of autism spectrum disorder. \*Development and Psychopathology, 20\*, 775–803.
50. Dawson, T. M., Golde, T. E., & Lagier-Tourenne, C. (2018). Animal models of neurodegenerative diseases. \*Nature Neuroscience\*. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0236-8>
51. De Falco, A., Cukierman, D. S., Hauser-Davis, R. A., & Rey, N. A. (2016). Alzheimer's disease: Etiological hypotheses and treatment perspectives. \*Química Nova, 39\*, 63-80.
52. de la Torre-Ubieta, L., Won, H., Stein, J. L., & Geschwind, D. H. (2016). Advancing the understanding of autism disease mechanisms through genetics. \*Nature Medicine, 22\*, 345–361.
53. DeFelipe, J., Alonso-Nanclares, L., & Arellano, J. I. (2002). Microstructure of the neocortex: Comparative aspects. \*Journal of Neurocytology, 31\*, 299–316. <https://doi.org/10.1023/A:1024130211265>
54. DeJesus-Hernandez, M., et al. (2011). Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. \*Neuron, 72\*, 245–256.
55. Demaegd, K., Schymkowitz, J., & Rousseau, F. (2018). Transcellular spreading of tau in tauopathies. \*ChemBioChem, 19\*(23), 2424-2432. <https://doi.org/10.1002/cbic.201800288>
56. den Abeelen, A. S. S. M., Lagro, J., van Beek, A. H. E. A., & Claassen, J. A. H. R. (2014). Impaired cerebral autoregulation and vasomotor reactivity in sporadic Alzheimer's disease. \*Current Alzheimer Research, 11\*, 11–17.



57. Detoraki, A., Staiano, R. I., Granata, F., Giannattasio, G., Prevete, N., de Paulis, A., Ribatti, D., Genovese, A., Triggiani, M., & Marone, G. (2009). Vascular endothelial growth factors synthesized by human lung mast cells exert angiogenic effects. *\*Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 123\*(5), 1142-1149.e1-5. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.01.044>
58. DeTure, M. A., & Dickson, D. W. (2019). The neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease. *\*Molecular Neurodegeneration*, 14\*(1), 32. <https://doi.org/10.1186/s13024-019-0333-5>
59. DeZonne, R. S., Sartore, R. C., Nascimento, J. M., Saia-Cereda, V. M., Romão, L. F., Alves-Leon, S. V., et al. (2017). Derivation of functional human astrocytes from cerebral organoids. *\*Scientific Reports*, 7\*, 45091. <https://doi.org/10.1038/srep45091>
60. DiLullo, E., & Kriegstein, A. R. (2017). The use of brain organoids to investigate neural development and disease. *\*Nature Reviews Neuroscience*, 18\*, 573–584. <https://doi.org/10.1038/nrn.2017.107>
61. dos Santos, P., Leide, C., Ozela, P. F., de Fátima de Brito Brito, M., Pinheiro, A. A., Padilha, E. C., ... & da Silva, H. M. (2018). Alzheimer's disease: A review from the pathophysiology to diagnosis, new perspectives for pharmacological treatment. *\*Current Medicinal Chemistry*, 25\*(26), 3141-3159.
62. Duffy, A. M., Bouchier-Hayes, D. J., & Harmey, J. H. (2013). Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its role in non-endothelial cells: Autocrine signaling by VEGF. In *Madame Curie Bioscience Database [Internet]*. Austin (TX): Landes Bioscience; 2000-2013. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6482/>
63. Duncan, G. S., Andrew, D. P., Takimoto, H., Kaufman, S. A., Yoshida, H., Spellberg, J., de la Pompa, J. L., Elia, A., Wakeham, A., Karan-Tamir, B., Muller, W. A., Senaldi, G., Zukowski, M. M., & Mak, T. W. (1999). Genetic evidence for functional redundancy of Platelet/Endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1): CD31-deficient mice reveal PECAM-1-dependent and PECAM-1-independent functions. *\*Journal of Immunology*, 162\*, 3022–3030.
64. Edmonson, C., Ziats, M. N., & Rennert, O. M. (2014). Altered glial marker expression in autistic post-mortem prefrontal cortex and cerebellum. *\*Molecular Autism*, 5\*, 9. <https://doi.org/10.1186/2040-2392-5-3>
65. Eiraku, M., Takata, N., Ishibashi, H., Kawada, M., Sakakura, E., Okuda, S., Sekiguchi, K., Adachi, T., & Sasai, Y. (2011). Self-organizing optic-cup morphogenesis in three-dimensional culture. *\*Nature*, 472\*, 51-56.
66. Eiraku, M., Watanabe, K., Matsuo-Takasaki, M., Kawada, M., Yonemura, S., Matsumura, M., Wataya, T., Nishiyama, A., Muguruma, K., & Sasai, Y. (2008). Self-organized formation of polarized cortical tissues from ESCs and its active manipulation by extrinsic signals. *\*Cell Stem Cell*, 3\*, 519-532.
67. Elston, G. N., Benavides-Piccione, R., & DeFelipe, J. (2001). The pyramidal cell in cognition: A comparative study in human and monkey. *\*Journal of Neuroscience*, 21\*, Rc163. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-17-j0002.2001>
68. Emanuele, E., Orsi, P., Barale, F., di Nemi, S. U., Bertona, M., & Politi, P. (2010). Serum levels of vascular endothelial growth factor and its receptors in patients with severe autism. *\*Clinical Biochemistry*, 43\*(3), 317–319. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2009.10.005>



69. Estes, M. L., & McAllister, A. K. (2015). Immune mediators in the brain and peripheral tissues in autism spectrum disorder. *Nature Reviews Neuroscience*, 16\*(8), 469–486. <https://doi.org/10.1038/nrn3978>
70. Exalto, L. G., Biessels, G. J., Karter, A. J., et al. (2013). Risk score for prediction of 10-year dementia risk in individuals with type 2 diabetes: A cohort study. *Lancet Diabetes & Endocrinology*, 1\*, 183–190.
71. Eyal, G., Verhoog, M. B., Testa-Silva, G., Deitcher, Y., Lodder, J. C., Benavides-Piccione, R., et al. (2016). Unique membrane properties and enhanced signal processing in human neocortical neurons. *eLife*, 5\*, e16553. <https://doi.org/10.7554/eLife.16553>
72. Fakhoury, M. (2018). Microglia and astrocytes in Alzheimer's disease: Implications for therapy. *Current Neuropharmacology*, 16\*(5), 508–518. <https://doi.org/10.2174/1570159X15666170720095240>
73. Falco, M. (2014). Autism rates now in 1 in 68 U.S. children: CDC. Available at: <http://www.cnn.com/2014/03/27/health/cdcautism/index.html?iref=allsearch>. Accessed April 3, 2014.
74. Farrall, A. J., & Wardlaw, J. M. (2009). Blood-brain barrier: Ageing and microvascular disease—systematic review and meta-analysis. *Neurobiology of Aging*, 30\*(3), 337–352.
75. Fett-Conte, A. C., Bossolani-Martins, A. L., & Rosan, D. R. A. Etiology of autism: The complexity of risk factors in autism spectrum disorder. Available at: [www.intechopen.com/books/autism-spectrum-disorder-recent-advances](http://www.intechopen.com/books/autism-spectrum-disorder-recent-advances). Accessed April 2, 2016.
76. Fietz, S. A., et al. (2010). OSVZ progenitors of human and ferret neocortex are epithelial-like and expand by integrin signaling. *Nature Neuroscience*, 13\*, 690–699.
77. Forestier, A., Douki, T., De Rosa, V., Béal, D., & Rachidi, W. (2015). Combination of A $\beta$  secretion and oxidative stress in an Alzheimer-like cell line leads to the over-expression of the nucleotide excision repair proteins DDB2 and XPC. *International Journal of Molecular Sciences*, 16\*(8), 17422–17444.
78. Galli, S. J., et al. (2008). Immunomodulatory mast cells: Negative, as well as positive, regulators of immunity. *Nature Reviews Immunology*, 8\*, 478–486.
79. Gan, L., Cookson, M. R., Petrucelli, L., et al. (2018). Converging pathways in neurodegeneration, from genetics to mechanisms. *Nature Neuroscience*, 21\*, 1300–1309. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0237-7>
80. Garber, K. (2007). Neuroscience: Autism's cause may reside in abnormalities at the synapse. *Science*, 317\*, 190–191.
81. Garcez, P. P., et al. (2016). Zika virus impairs growth in human neurospheres and brain organoids. *Science*, 352\*, 816–818.
82. Gauthier, J., Siddiqui, T. J., Huashan, P., Yokomaku, D., Hamdan, F. F., Champagne, N., et al. (2011). Truncating mutations in NRXN2 and NRXN1 in autism spectrum disorders and schizophrenia. *Human Genetics*, 130\*, 563–573.
83. Giandomenico, S. L., & Lancaster, M. A. (2017). Probing human brain evolution and development in organoids. *Current Opinion in Cell Biology*, 44\*, 36–43. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2017.01.001>

84. Gonsette, R. E. (2008). Neurodegeneration in multiple sclerosis: The role of oxidative stress and excitotoxicity. \*Journal of Neurological Sciences, 274\*(1-2), 48-53. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2008.06.029>
85. Gonzalez, C., Armijo, E., Bravo-Alegria, J., Becerra-Calixto, A., Mays, C. E., & Soto, C. (2018). Modeling amyloid beta and tau pathology in human cerebral organoids. \*Molecular Psychiatry\*. <https://doi.org/10.1038/s41380-018-0229-8>
86. Gottesman, R. F., Schneider, A. L., Albert, M., et al. (2014). Midlife hypertension and 20-year cognitive change: The Atherosclerosis Risk in Communities Neurocognitive Study. \*JAMA Neurology, 71\*, 1218–1227.
87. Grabrucker, A. M. (2013). Environmental factors in autism. \*Frontiers in Psychiatry, 2012\*, 118.
88. Grammas, P., & Ovase, R. (2001). Inflammatory factors are elevated in brain microvessels in Alzheimer's disease. \*Neurobiology of Aging, 22\*(6), 837–842.
89. Grebenyuk, S., & Ranga, A. (2019). Engineering organoid vascularization. \*Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 7\*, 39.
90. Guerreiro, R., et al. (2018). Investigating the genetic architecture of dementia with Lewy bodies: A two-stage genome-wide association study. \*Lancet Neurology, 17\*, 64–74.
91. Guerreiro, R., et al. (2013). TREM2 variants in Alzheimer's disease. \*New England Journal of Medicine, 368\*, 117–127.
92. Gupta, S., Aggarwal, S., Rashanravan, B., & Lee, T. (1998). Th1- and Th2-like cytokines in CD4(+) and CD8(+) T cells in autism. \*Journal of Neuroimmunology, 85\*, 106–109. [https://doi.org/10.1016/S0165-5728\(98\)00021-6](https://doi.org/10.1016/S0165-5728(98)00021-6)
93. Hanamsagar, R., & Bilbo, S. D. (2017). Environment matters: Microglia function and dysfunction in a changing world. \*Current Opinion in Neurobiology, 47\*, 146-155. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2017.10.007>
94. Hardy, J., & Orr, H. (2006). The genetics of neurodegenerative diseases. \*Journal of Neurochemistry, 97\*, 1690–1699.
95. Hardy, J. A., & Higgins, G. A. (1992). Alzheimer's disease: The amyloid cascade hypothesis. \*Science, 256\*(5054), 184-185. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1566067>
96. Hattori, N. (2013). Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. \*Movement Disorders, 29\*(2), 185. <https://doi.org/10.1002/mds.25740>
97. He, Q., Duan, Y., Karsch, K., & Miles, J. (2010). Detecting corpus callosum abnormalities in autism based on anatomical landmarks. \*Psychiatry Research, 183\*, 126–132.
98. Helms, H. C., et al. (2016). In vitro models of the blood–brain barrier: An overview of commonly used brain endothelial cell culture models and guidelines for their use. \*Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism, 36\*, 862–890.
99. Herculano-Houzel, S. (2009). The human brain in numbers: A linearly scaled-up primate brain. \*Frontiers in Human Neuroscience, 3\*, 31. <https://doi.org/10.3389/neuro.09.031.2009>



100. Heyer, D. B., & Meredith, R. M. (2017). Environmental toxicology: Sensitive periods of development and neurodevelopmental disorders. *\*NeuroToxicology, 58\**, 23–41. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2016.10.017>
101. Heymann, D. L., Hodgson, A., Sall, A. A., Freedman, D. O., Staples, J. E., Althabe, F., Baruah, K., Mahmud, G., Kandun, N., Vasconcelos, P. F., et al. (2016). Zika virus and microcephaly: Why is this situation a PHEIC? *\*Lancet, 387\**.
102. Hirsch, S., Reichold, J., Schneider, M., Székely, G., & Weber, B. (2012). Topology and hemodynamics of the cortical cerebrovascular system. *\*Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism, 32\*(6)*, 952–967.
103. Hockemeyer, D., & Jaenisch, R. (2016). Induced pluripotent stem cells meet genome editing. *\*Cell Stem Cell, 18\**, 573–586.
104. Höglinger, G. U., et al. (2011). Identification of common variants influencing risk of the tauopathy progressive supranuclear palsy. *\*Nature Genetics, 43\**, 699–705.
105. Huang, Y., & Mahley, R. W. (2014). Apolipoprotein E: Structure and function in lipid metabolism, neurobiology, and Alzheimer's diseases. *\*Neurobiology of Disease, 72\*(Pt A)*, 3–12.
106. Iadecola, C. (2017). The neurovascular unit coming of age: A journey through neurovascular coupling in health and disease. *\*Neuron, 96\**, 17–42.
107. Iefremova, V., Manikakis, G., Krefft, O., Jabali, A., Weynans, K., Wilkens, R., Marsoner, F., Brändl, B., Müller, F. J., Koch, P., & Ladewig, J. (2017). An organoid-based model of cortical development identifies noncell-autonomous defects in Wnt signaling contributing to Miller-Dieker syndrome. *\*Cell Reports, 19\**, 50–59. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.03.047>
108. Ilieva, M., Fex Svenningsen, Å., Thorsen, M., & Michel, T. M. (2018). Psychiatry in a dish: Stem cells and brain organoids modeling autism spectrum disorders. *\*Biological Psychiatry, 83\*(7)*, 558–568. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2017.11.011>
109. Inouye, K., Pedrazzani, E. S., & Pavarini, S. C. I. (2010). Alzheimer's disease influence on the perception of quality of life from elderly people. *\*Revista da Escola de Enfermagem da USP, 44\*(4)*, 1093–1099.
110. Iossifov, I., Ronemus, M., Levy, D., Wang, Z., Hakker, I., Rosenbaum, J., Yamrom, B., Lee, Y. H., Narzisi, G., Leotta, A., et al. (2012). De novo gene disruptions in children on the autistic spectrum. *\*Neuron, 74\**, 285–299.
111. Ip, J. P. K., Mellios, N., & Sur, M. (2018). Rett syndrome: Insights into genetic, molecular, and circuit mechanisms. *\*Nature Reviews Neuroscience, 19\**, 368–382. <https://doi.org/10.1038/s41583-018-0006-3>
112. Iturria-Medina, Y., et al. (2016). Early role of vascular dysregulation on late-onset Alzheimer's disease based on multifactorial data-driven analysis. *\*Nature Communications, 7\**, 11934.
113. Jay, G. W., Demattos, R. B., Weinstein, E. J., Philbert, M. A., Pardo, I. D., & Brown, T. P. (2011). Animal models for neural diseases. *\*Toxicologic Pathology, 39\*(1)*, 167–169. <https://doi.org/10.1177/0192623310389478>

114. Jucker, M., & Walker, L. C. (2011). Pathogenic protein seeding in Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders. *\*Annals of Neurology, 70\*(4), 532-540.* <https://doi.org/10.1002/ana.22615>
115. Jucker, M., & Walker, L. (2013). Self-propagation of pathogenic protein aggregates in neurodegenerative diseases. *\*Nature, 501\**, 45–51. <https://doi.org/10.1038/nature12481>
116. Just, M. A., Keller, T. A., Malave, V. L., Kana, R. K., & Varma, S. (2012). Autism as a neural systems disorder: A theory of frontal-posterior underconnectivity. *\*Neuroscience & Biobehavioral Reviews, 36\**, 1292–1313.
117. Kalesnikoff, J., & Galli, S. J. (2008). New developments in mast cell biology. *\*Nature Immunology, 9\**, 1215–1223.
118. Kamenoy, Y., Iwata, K., Matsuzaki, H., Miyachi, T., Tsuchiya, K. J., Matsumoto, K., & Mori, N. (2013). Serum levels of soluble platelet endothelial cell adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 are decreased in subjects with autism spectrum disorder. *\*Molecular Autism, 4\*(1), 19.* <https://doi.org/10.1186/2040-2392-4-19>
119. Karayiorgou, M., Simon, T. J., & Gogos, J. A. (2010). 22q11.2 microdeletions: Linking DNA structural variation to brain dysfunction and schizophrenia. *\*Nature Reviews Neuroscience, 11\**, 402–416.
120. Karch, C. M., & Goate, A. M. (2015). Alzheimer's disease risk genes and mechanisms of disease pathogenesis. *\*Biological Psychiatry, 77\**, 43–51.
121. Karpowicz, R. J., Trojanowski, J. Q., & Lee, V. M. (2019). Transmission of  $\alpha$ -synuclein seeds in neurodegenerative disease: Recent developments. *\*Laboratory Investigation, 99\**, 971–981. <https://doi.org/10.1038/s41374-019-0195-z>
122. Kelava, I., & Lancaster, M. A. (2016a). Dishing out mini-brains: Current progress and future prospects in brain organoid research. *\*Developmental Biology, 420\**, 199–209. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2016.06.037>
123. Kelava, I., & Lancaster, M. A. (2016b). Stem cell models of human brain development. *\*Cell Stem Cell, 18\**, 736–748. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.05.022>
124. Kern, J. K., et al. (2015). Shared brain connectivity issues, symptoms, and comorbidities in autism spectrum disorder, attention deficit/hyperactivity disorder, and Tourette syndrome. *\*Brain Connectivity, 5\*(6), 321-335.*
125. Kim, H., Park, H. J., Choi, H., et al. (2019). Modeling G2019S-LRRK2 sporadic Parkinson's disease in 3D midbrain organoids. *\*Stem Cell Reports, 12\*(3), 518-531.* <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2019.01.020>
126. Kim, K. C., Gonzales, E. L., Lazaro, M. T., et al. (2016). Clinical and neurobiological relevance of current animal models of autism spectrum disorders. *\*Biomolecules & Therapeutics, 24\*(3), 207–243.*
127. Kim, J., Koo, B. K., & Yoon, K. J. (2019). Modeling host-virus interactions in viral infectious diseases using stem-cell-derived systems and CRISPR/Cas9 technology. *\*Viruses, 11\**, E124.

128. King, B. H., & Lord, C. (2011). Is schizophrenia on the autism spectrum? *\*Brain Research*, 1380\*, 34–41.
129. Klohs, J. (2019). An integrated view on vascular dysfunction in Alzheimer’s disease. *\*Neurodegenerative Diseases*, 19\*, 109-127. <https://doi.org/10.1159/000505625>
130. Komssi, S., & Kähkönen, S. (2006). The novelty value of the combined use of electroencephalography and transcranial magnetic stimulation for neuroscience research. *\*Brain Research Reviews*, 52\*, 183–192. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2006.01.008>
131. Koo, B., Choi, B., Park, H., & Yoon, K. J. (2019). Past, present, and future of brain organoid technology. *\*Molecules and Cells*, 42\*(9), 617.
132. Krabbe, G., Halle, A., Matyash, V., Rinnenthal, J. L., Eom, G. D., Bernhardt, U., Miller, K. R., Prokop, S., Kettenmann, H., & Heppner, F. L. (2013). Functional impairment of microglia coincides with beta-amyloid deposition in mice with Alzheimer-like pathology. *\*PLoS ONE*, 8\*(4), e60921. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060921>
133. Krabbe, G., et al. (2017). Microglial NFκB-TNFα hyperactivation induces obsessive-compulsive behavior in mouse models of progranulin-deficient frontotemporal dementia. *\*Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 114\*, 5029–5034.
134. Kriegstein, A. R., & Noctor, S. C. (2004). Patterns of neuronal migration in the embryonic cortex. *\*Trends in Neurosciences*, 27\*, 392-399.
135. Kushner, D. (2011). The autism defense. *\*IEEE Spectrum*, 48\*, 33–37.
136. Lai, G., Pantazatos, S. P., Schneider, H., & Hirsch, J. (2012). Neural systems for speech and song in autism. *\*Brain*, 135\*, 961–975.
137. Lancaster, M. A., & Knoblich, J. A. (2014b). Generation of cerebral organoids from human pluripotent stem cells. *\*Nature Protocols*, 9\*, 2329–2340.
138. Lancaster, M. A., Renner, M., Martin, C. A., Wenzel, D., Bicknell, L. S., Hurles, M. E., Homfray, T., Penninger, J. M., Jackson, A. P., & Knoblich, J. A. (2013). Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *\*Nature*, 501\*(7467), 373–379. <https://doi.org/10.1038/nature12517>
139. Lancaster, M. A., & Knoblich, J. A. (2014a). Organogenesis in a dish: Modeling development and disease using organoid technologies. *\*Science*, 345\*, 1247125.
140. Lau, P., Bossers, K., Janky, R., et al. (2013). Alteration of the microRNA network during the progression of Alzheimer’s disease. *\*EMBO Molecular Medicine*, 5\*, 1613–1634.
141. Lavazza, A., & Massimini, M. (2018). Cerebral organoids: Ethical issues and consciousness assessment. *\*Journal of Medical Ethics*, 44\*, 606–610. <https://doi.org/10.1136/medethics-2017-104555>
142. Lee, C. Y., & Landreth, G. E. (2010). The role of microglia in amyloid clearance from the AD brain. *\*Journal of Neural Transmission (Vienna)*, 117\*(8), 949–960. <https://doi.org/10.1007/s00702-010-0433-4>
143. Lee, S. J. (1999). Adhesion molecule expression and regulation on cells of the central nervous system. *\*Journal of Neuroimmunology*, 98\*, 77–88.

144. Lee, C.-T., Chen, J., Kindberg, A. A., Bendriem, R. M., Spivak, C. E., Williams, M. P., et al. (2017). CYP3A5 mediates effects of cocaine on human neocorticalogenesis: Studies using an in vitro 3D self-organized hPSC model with a single cortex-like unit. *\*Neuropsychopharmacology, 42\**, 774–784. <https://doi.org/10.1038/npp.2016.156>
145. Levitt, P., & Veenstra-VanderWeele, J. (2015). Neurodevelopment and the origins of brain disorders. *\*Neuropsychopharmacology, 40\**, 1-3.
146. Li, X., Chauhan, A., Sheikh, A. M., Patil, S., Chauhan, V., & Li, X. M. (2009). Elevated immune response in the brain of autistic patients. *\*Journal of Neuroimmunology, 207\**, 111–116.
147. Li, Y., Muffat, J., Omer, A., Bosch, I., Lancaster, M. A., Sur, M., Gehrke, L., Knoblich, J. A., & Jaenisch, R. (2017). Induction of expansion and folding in human cerebral organoids. *\*Cell Stem Cell, 20\**, 385–396.e3. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.11.017>
148. Lieberman, A. P., Shakkottai, V. G., & Albin, R. L. (2019). Polyglutamine repeats in neurodegenerative diseases. *\*Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease, 14\**, 1-27. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis-012418-012857>
149. Lim, E. T., et al. (2017). Rates, distribution and implications of postzygotic mosaic mutations in autism spectrum disorder. *\*Nature Neuroscience, 20\**, 1217–1224.
150. Lin, Y. T., Seo, J., Gao, F., Feldman, H. M., Wen, H. L., Penney, J., Cam, H. P., Gjoneska, E., Raja, W. K., Cheng, J., et al. (2018). APOE4 causes widespread molecular and cellular alterations associated with Alzheimer’s disease phenotypes in human iPSC-derived brain cell types. *\*Neuron, 98\**, 1141–1154.e7.
151. Lindborg, B. A., et al. (2016). 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, 5\**, 970–979.
152. Linkous, A., Balamatsias, D., Snuderl, M., Pisapia, D., Liston, C., & Correspondence, H. A. F. (2019). Modeling patient-derived glioblastoma with cerebral organoids. *\*Cell Reports, 26\**, 3203-3211.e5.
153. Lionel, A. C., Vaags, A. K., Sato, D., Gazzellone, M. J., Mitchell, E. B., Chen, H. Y., et al. (2013). Rare exonic deletions implicate the synaptic organizer Gephyrin (GPHN) in risk for autism, schizophrenia, and seizures. *\*Human Molecular Genetics, 22\**, 2055–2066.
154. Liu, R. X., Huang, C., Bennett, D. A., Li, H., & Wang, R. (2016). The characteristics of astrocyte on A $\beta$  clearance altered in Alzheimer’s disease were reversed by anti-inflammatory agent (+)-2-(1-hydroxyl-4-oxocyclohexyl) ethyl caffeate. *\*American Journal of Translational Research, 8\*(10)*, 4082–4094.
155. Liu, J., Liu, Z., Zhang, Y., & Yin, F. (2015). A novel antagonistic role of natural compound icariin on neurotoxicity of amyloid  $\beta$  peptide. *\*Indian Journal of Medical Research, 142\*(2)*, 190-195.
156. Lodato, S., & Arlotta, P. (2015). Generating neuronal diversity in the mammalian cerebral cortex. *\*Annual Review of Cell and Developmental Biology, 31\**, 699–720.
157. Luo, C., et al. (2016). Cerebral organoids recapitulate epigenomic signatures of the human fetal brain. *\*Cell Reports, 17\**, 3369–3384.

158. Manning, M., Hudgins, L., Professional, P., & Guidelines, C. (2010). Array-based technology and recommendations for utilization in medical genetics practice for detection of chromosomal abnormalities. *\*Genetics in Medicine, 12\**, 742–745.
159. Mansour, A. A., Gonçalves, J. T., Bloyd, C. W., Li, H., Fernandes, S., Quang, D., Johnston, S., Parylak, S. L., Jin, X., & Gage, F. H. (2018). An in vivo model of functional and vascularized human brain organoids. *\*Nature Biotechnology, 36\**, 432–441. <https://doi.org/10.1038/nbt.4127>
160. Marchetto, M. C., Carromeu, C., Acab, A., Yu, D., Yeo, G. W., Mu, Y., Chen, G., Gage, F. H., & Muotri, A. R. (2010). A model for neural development and treatment of Rett syndrome using human induced pluripotent stem cells. *\*Cell, 143\**, 527–539.
161. Mariani, J., Coppola, G., Zhang, P., Abyzov, A., Provini, L., Tomasini, L., et al. (2015). FOXP1-dependent dysregulation of GABA/glutamate neuron differentiation in autism spectrum disorders. *\*Cell, 162\**, 375–390. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.06.034>
162. Marques, A. H., O'Connor, T. G., Roth, C., Susser, E., & Bjorke-Monsen, A. L. (2013). The influence of maternal prenatal and early childhood nutrition and maternal prenatal stress on offspring immune system development and neurodevelopmental disorders. *\*Frontiers in Neuroscience, 7\**, 120.
163. Martínez, T., Wright, N., López-Fraga, M., Jiménez, A. I., & Pañeda, C. (2013). Silencing human genetic diseases with oligonucleotide-based therapies. *\*Human Genetics, 132\**, 481–493.
164. McGann, J. C., Liroy, D. T., & Mandel, G. (2012). Astrocytes conspire with neurons during progression of neurological disease. *\*Current Opinion in Neurobiology, 22\**, 850–858. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2012.03.009>
165. Mellios, N., Feldman, D. A., Sheridan, S. D., Ip, J. P. K., Kwok, S., Amoah, S. K., Rosen, B., Rodriguez, B. A., Crawford, B., Swaminathan, R., Chou, S., Li, Y., Ziats, M., Ernst, C., Jaenisch, R., Haggarty, S. J., & Sur, M. (2018). MeCP2-regulated miRNAs control early human neurogenesis through differential effects on ERK and AKT signaling. *\*Molecular Psychiatry, 23\**, 1051–1065. <https://doi.org/10.1038/mp.2017.86>
166. Merlini, M., Rafalski, V. A., Rios Coronado, P. E., Gill, T. M., Ellisman, M., Muthukumar, G., et al. (2019). Fibrinogen induces microglia-mediated spine elimination and cognitive impairment in an Alzheimer's disease model. *\*Neuron, 101\*(6)*, 1099–1108.e6.
167. Miller, A. J., Dye, B. R., Ferrer-Torres, D., et al. (2019). Generation of lung organoids from human pluripotent stem cells in vitro. *\*Nature Protocols, 14\**, 518–540. <https://doi.org/10.1038/s41596-018-0104-8>
168. Masic, B., Doesburg, S. M., Fatima, Z., Vidal, J., Vakorin, V. A., Taylor, M. J., & McIntosh, A. R. (2014). Coordinated information generation and mental flexibility: Large-scale network disruption in children with autism. *\*Cerebral Cortex\**. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhu082>
169. Mitchell, K. J. (2011). The genetics of neurodevelopmental disease. *\*Current Opinion in Neurobiology, 21\**, 197–203.
170. Miyake, K., Hirasawa, T., Koide, T., & Kubota, T. (2012). Epigenetics in autism and other neurodevelopmental diseases. *\*Advances in Experimental Medicine and Biology, 724\**, 91–98. [https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0653-2\\_7](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0653-2_7)



171. Mohan, H., Verhoog, M. B., Doreswamy, K. K., Eyal, G., Aardse, R., Lodder, B. N., et al. (2015). Dendritic and axonal architecture of individual pyramidal neurons across layers of adult human neocortex. *\*Cerebral Cortex, 25\**, 4839–4853. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhv188>
172. Montagne, A., Nation, D. A., Sagare, A. P., et al. (2020). APOE4 leads to blood-brain barrier dysfunction predicting cognitive decline. *\*Nature, 581\**(7806), 71–76. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2247-3>
173. Monzel, A. S., et al. (2017). Derivation of human midbrain-specific organoids from neuroepithelial stem cells. *\*Stem Cell Reports, 8\**, 1144–1154.
174. Moon, K., Filis, A. K., & Cohen, A. R. (2010). The birth and evolution of neuroscience through cadaveric dissection. *\*Neurosurgery, 67\**, 799–810. <https://doi.org/10.1227/01.neu.0000383135.92953.a3>
175. Moreno-De-Luca, A., Myers, S. M., Challman, T. D., Moreno-De-Luca, D., Evans, D. W., & Ledbetter, D. H. (2013). Developmental brain dysfunction: Revival and expansion of old concepts based on new genetic evidence. *\*The Lancet Neurology, 12\**, 406–414.
176. Morimoto, K., Horio, J., Satoh, H., Sue, L., Beach, T., Arita, S., Tooyama, I., & Konishi, Y. (2011). Expression profiles of cytokines in the brains of Alzheimer's disease patients compared to the brains of non-demented patients with and without increasing Alzheimer pathology. *\*Journal of Alzheimer's Disease, 25\**(1), 59–76.
177. Movsas, T. Z., Pinto-Martin, J. A., Whitaker, A. H., Feldman, J. F., Lorenz, J. M., Korzeniewski, S. J., Levy, S. E., & Paneth, N. (2013). Autism spectrum disorder is associated with ventricular enlargement in a low birth weight population. *\*The Journal of Pediatrics, 163\**(1), 73–78. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2012.12.084>
178. Muffat, J., et al. (2016). Efficient derivation of microglia-like cells from human pluripotent stem cells. *\*Nature Medicine, 22\**, 1358–1367.
179. Muguruma, K., Nishiyama, A., Kawakami, H., Hashimoto, K., & Sasai, Y. (2015). Self-organization of polarized cerebellar tissue in 3D culture of human pluripotent stem cells. *\*Cell Reports, 10\**, 537–550.
180. Mukherjee, S. B. (2017). Autism spectrum disorders—Diagnosis and management. *\*The Indian Journal of Pediatrics, 84\**(4), 307–314.
181. Muller, W. A. (1995). The role of PECAM-1 (CD31) in leukocyte emigration: Studies in vitro and in vivo. *\*Journal of Leukocyte Biology, 57\**, 523–528.
182. Mullin, A. P., et al. (2013). Neurodevelopmental disorders: Mechanisms and boundary definitions from genomes, interactomes, and proteomes. *\*Translational Psychiatry, 3\**(12), e329. <https://doi.org/10.1038/tp.2013.89>
183. Muotri, A. R. (2016). The human model: Changing focus on autism research. *\*Biological Psychiatry, 79\**, 642–649. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2015.03.012>
184. Murray, M. E., Graff-Radford, N. R., Ross, O. A., Petersen, R. C., Duara, R., & Dickson, D. W. (2011). Neuropathologically defined subtypes of Alzheimer's disease with distinct clinical characteristics: A retrospective study. *\*The Lancet Neurology, 10\**, 785–796.

185. Nagele, R. G., D'Andrea, M. R., Lee, H., Venkataraman, V., & Wang, H. Y. (2003). Astrocytes accumulate A $\beta$ 42 and give rise to astrocytic amyloid plaques in Alzheimer disease brains. *\*Brain Research*, 971\*(2), 197–209. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(03\)02361-8](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(03)02361-8)
186. Neniskyte, U., & Gross, C. T. (2017). Errant gardeners: Glial-cell-dependent synaptic pruning and neurodevelopmental disorders. *\*Nature Reviews Neuroscience*, 18\*(11), 658–670.
187. Nicolson, R., DeVito, T. J., Vidal, C. N., Sui, Y., Hayashi, K. M., Drost, D. J., et al. (2006). Detection and mapping of hippocampal abnormalities in autism. *\*Psychiatry Research*, 148\*, 11–21.
188. Niedowicz, D. M., Nelson, P. T., & Murphy, M. P. (2011). Alzheimer's disease: Pathological mechanisms and recent insights. *\*Current Neuropharmacology*, 9\*(4), 674–684. <https://doi.org/10.2174/157015911798376181>
189. Noor, A., Whibley, A., Marshall, C. R., Gianakopoulos, P. J., Piton, A., Carson, A. R., Orlic-Milacic, M., Lionel, A. C., Sato, D., Pinto, D., et al. (2010). Disruption at the PTCHD1 locus on Xp22.11 in autism spectrum disorder and intellectual disability. *\*Science Translational Medicine*, 2\*, 1–9.
190. Norton, S., Matthews, F. E., Barnes, D. E., Yaffe, K., & Brayne, C. (2014). Potential for primary prevention of Alzheimer's disease: An analysis of population-based data. *\*Lancet Neurology*, 13\*, 788–794.
191. Nzou, G., Wicks, R. T., Wicks, E. E., Seale, S. A., Sane, C. H., Chen, A., et al. (2018). Human cortex spheroid with a functional blood-brain barrier for high-throughput neurotoxicity screening and disease modeling. *\*Scientific Reports*, 8\*, 7413. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25603-5>
192. O'Brien, R. J., & Wong, P. C. (2011). Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease. *\*Annual Review of Neuroscience*, 34\*, 185–204. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-061010-113613>
193. Oh, Y., & Jang, J. (2019). Directed differentiation of pluripotent stem cells by transcription factors. *\*Molecular Cells*, 42\*, 200–209.
194. Oliveira, B., Yahya, A. Ç., & Novarino, G. (2019). Modeling cell-cell interactions in the brain using cerebral organoids. *\*Brain Research*, 1724\*, 146458. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2019.146458>
195. Ormel, P. R., Vieira de Sá, R., van Bodegraven, E. J., Karst, H., Harschnitz, O., Sneeboer, M. A. M., Johansen, L. E., van Dijk, R. E., Scheefhals, N., Berdenis van Berlekom, A., Ribes Martínez, E., Kling, S., MacGillavry, H. D., van den Berg, L. H., Kahn, R. S., Hol, E. M., de Witte, L. D., & Pasterkamp, R. J. (2018). Microglia innately develop within cerebral organoids. *\*Nature Communications*, 9\*, 4167. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06684-2>
196. Ornoy, A., Weinstein-Fudim, L., & Ergaz, Z. (2015). Prenatal factors associated with autism spectrum disorder (ASD). *\*Reproductive Toxicology*, 56\*, 155–169.
197. Orr, M. E., Sullivan, A. C., & Frost, B. (2017). A brief overview of tauopathy: Causes, consequences, and therapeutic strategies. *\*Trends in Pharmacological Sciences*, 38\*(7), 637–648. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2017.03.011>

198. Orta-Salazar, E., Cuellar-Lemus, C. A., Díaz-Cintra, S., & Feria-Velasco, A. I. (2014). Cholinergic markers in the cortex and hippocampus of some animal species and their correlation to Alzheimer's disease. *\*Neurología (English Edition), 29\*(8), 497–503.* <https://doi.org/10.1016/j.nrleng.2012.10.010>
199. Pacitti, D., Privolizzi, R., & Bax, B. E. (2019). Organs to cells and cells to organoids: The evolution of in vitro central nervous system modeling. *\*Frontiers in Cellular Neuroscience, 13\**. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00129>
200. Parikshak, N. N., Luo, R., Zhang, A., Won, H., Lowe, J. K., Chandran, V., Horvath, S., & Geschwind, D. H. (2013). Integrative functional genomic analyses implicate specific molecular pathways and circuits in autism. *\*Cell, 155\**, 1008–1021.
201. Partridge, B., & Rossmeisl, J. H. Jr. (2019). Companion animal models of neurological disease. *\*Journal of Neuroscience Methods\**, 108484.
202. Pasca, A. M., Sloan, S. A., Clarke, L. E., Tian, Y., Makinson, C. D., Huber, N., Kim, C. H., Park, J. Y., O'Rourke, N. A., Nguyen, K. D., et al. (2015). Functional cortical neurons and astrocytes from human pluripotent stem cells in 3D culture. *\*Nature Methods, 12\**, 671–678.
203. Pasca, S. P. (2018). The rise of three-dimensional human brain cultures. *\*Nature, 553\**, 437. <https://doi.org/10.1038/nature25032>
204. Perl, D. P. (2010). Neuropathology of Alzheimer's disease. *\*Mount Sinai Journal of Medicine, 77\*(1), 32–42.*
205. Petrelli, F., & Bezzi, P. (2016). Novel insights into gliotransmitters. *\*Current Opinion in Pharmacology, 26\**, 138–145. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2015.11.010>
206. Pettinato, G., Wen, X., & Zhang, N. (2015). Engineering strategies for the formation of embryoid bodies from human pluripotent stem cells. *\*Stem Cells and Development, 24\*(14), 1595–1609.* <https://doi.org/10.1089/scd.2014.0427>
207. Pham, M. T., Pollock, K. M., Rose, M. D., Cary, W. A., Stewart, H. R., Zhou, P., Nolta, J. A., & Waldau, B. (2018). Generation of human vascularized brain organoids. *\*Neuroreport, 29\**, 588–593. <https://doi.org/10.1097/WNR.0000000000001014>
208. Plummer, S., Wallace, S., Ball, G., Lloyd, R., Schiapparelli, P., Quiñones-Hinojosa, A., Hartung, T., & Pamies, D. (2019). A human iPSC-derived 3D platform using primary brain cancer cells to study drug development and personalized medicine. *\*Scientific Reports, 9\**, 1407. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37481-6>
209. Prince, M., Bryce, R., Albanese, E., Wimo, A., Ribeiro, W., & Ferri, C. P. (2013). The global prevalence of dementia: A systematic review and meta-analysis. *\*Alzheimer's & Dementia, 9\**, 63–75.
210. Prince, M., et al. (2013). The global prevalence of dementia: A systematic review and meta-analysis. *\*Alzheimer's & Dementia, 9\**, 63–75.e2.
211. Qian, X., Nguyen, H. N., Song, M. M., Hadiono, C., Ogden, S. C., Hammack, C., Yao, B., Hamersky, G. R., Jacob, F., Zhong, C., et al. (2016). Brain-region-specific organoids using mini-bioreactors for modeling ZIKV exposure. *\*Cell, 165\**, 1238–1254.

212. Qian, X., Song, H., & Ming, G. L. (2019). Brain organoids: Advances, applications, and challenges. *\*Development*, 146\*, dev166074. <https://doi.org/10.1242/dev.166074>
213. Quadrato, G., et al. (2017). Cell diversity and network dynamics in photosensitive human brain organoids. *\*Nature*, 545\*, 48–53.
214. Raja, W. K., Mungenast, A. E., Lin, Y. T., Ko, T., Abdurrob, F., Seo, J., & Tsai, L. H. (2016). Self-organizing 3D human neural tissue derived from induced pluripotent stem cells recapitulate Alzheimer's disease phenotypes. *\*PLoS One*, 11\*, 1–18.
215. Renner, M., Lancaster, M. A., Bian, S., Choi, H., Ku, T., Peer, A., Chung, K., & Knoblich, J. A. (2017). Self-organized developmental patterning and differentiation in cerebral organoids. *\*EMBO Journal*, 36\*, 1316–1329.
216. Renton, A. E., et al. (2011). A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD. *\*Neuron*, 72\*, 257–268.
217. Retallack, H., et al. (2016). Zika virus cell tropism in the developing human brain and inhibition by azithromycin. *\*Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 113\*, 14408–14413.
218. Rodriguez, J. I., & Kern, J. K. (2011). Evidence of microglial activation in autism and its possible role in brain underconnectivity. *\*Neuron Glia Biology*, 7\*, 205–213.
219. Roher, A. E., Debbins, J. P., Malek-Ahmadi, M., Chen, K., Pipe, J. G., Maze, S., et al. (2012). Cerebral blood flow in Alzheimer's disease. *\*Vascular Health and Risk Management*, 8\*, 599–611.
220. Rossi, G., Manfrin, A., & Lutolf, M. P. (2018). Progress and potential in organoid research. *\*Nature Reviews Genetics*, 19\*, 671–687. <https://doi.org/10.1038/s41576-018-0051-9>
221. Rossignol, D. A., & Frye, R. E. (2012). A review of research trends in physiological abnormalities in autism spectrum disorders: Immune dysregulation, inflammation, oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and environmental toxicant exposures. *\*Molecular Psychiatry*, 17\*, 389–401.
222. Roth, G., & Dicke, U. (2005). Evolution of the brain and intelligence. *\*Trends in Cognitive Sciences*, 9\*, 250–257. <https://doi.org/10.1016/j.tics.2005.03.005>
223. Rozniecki, J. J., et al. (1999). Morphological and functional demonstration of rat dura mast cell-neuron interactions in vitro and in vivo. *\*Brain Research*, 849\*, 1–15.
224. Russo, F. B., Freitas, B. C., Pignatari, G. C., Fernandes, I. R., Sebat, J., Muotri, A. R., & Beltrão-Braga, P. C. B. (2018). Modeling the interplay between neurons and astrocytes in autism using human induced pluripotent stem cells. *\*Biological Psychiatry*, 83\*(7), 569–578.
225. Sachs, N., de Ligt, J., Kopper, O., Gogola, E., Bounova, G., Weeber, F., Balgobind, A. V., Wind, K., Gracanin, A., Begthel, H., et al. (2018). A living biobank of breast cancer organoids captures disease heterogeneity. *\*Cell*, 172\*, 373–386.e10. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.12.018>
226. Sajja, V. S., Hlavac, N., & VandeVord, P. J. (2016). Role of glia in memory deficits following traumatic brain injury: Biomarkers of glia dysfunction. *\*Frontiers in Integrative Neuroscience\**, 10, 7. <https://doi.org/10.3389/fnint.2016.00007>

227. Sakaguchi, H., et al. (2015). Generation of functional hippocampal neurons from self-organizing human embryonic stem cell-derived dorsomedial telencephalic tissue. *\*Nature Communications\**, 6, 8896. <https://doi.org/10.1038/ncomms9896>
228. Sanders, S. J., Murtha, M. T., Gupta, A. R., Murdoch, J. D., Raubeson, M. J., Willsey, A. J., Ercan-Sencicek, A. G., DiLullo, N. M., Parikshak, N. N., Stein, J. L., et al. (2012). De novo mutations revealed by whole-exome sequencing are strongly associated with autism. *\*Nature\**, 485, 237–241. <https://doi.org/10.1038/nature10945>
229. Sandhoff, K., Harzer, K., Wässle, W., & Jatzkewitz, H. (1971). Enzyme alterations and lipid storage in three variants of Tay-Sachs disease. *\*Journal of Neurochemistry\**, 18(12), 2469–2489. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1971.tb00204.x>
230. Savatt, J. M., & Myers, S. M. (2021). Genetic testing in neurodevelopmental disorders. *\*Frontiers in Pediatrics\**, 9, 526779. <https://doi.org/10.3389/fped.2021.526779>
231. Scheltens, P., Blennow, K., Breteler, M. M. B., de Strooper, B., Frisoni, G. B., Salloway, S., & Van der Flier, W. M. (2016). Alzheimer's disease. *\*The Lancet\**, 388(10043), 505–517. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(15\)01124-1](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(15)01124-1)
232. Schipul, S. E., Williams, D. L., Keller, T. A., Minshew, N. J., & Just, M. A. (2012). Distinctive neural processes during learning in autism. *\*Cerebral Cortex\**, 22(4), 937–950. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhr192>
233. Schöls, L., et al. (2015). No Parkinsonism in SCA2 and SCA3 despite severe neurodegeneration of the dopaminergic substantia nigra. *\*Brain\**, 138(12), 3316–3326. <https://doi.org/10.1093/brain/awv209>
234. Scholz, S. W., et al. (2009). SNCA variants are associated with increased risk for multiple system atrophy. *\*Annals of Neurology\**, 65(6), 610–614. <https://doi.org/10.1002/ana.21704>
235. Schwab, C., & McGeer, P. L. (2008). Inflammatory aspects of Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders. *\*Journal of Alzheimer's Disease\**, 13(4), 359–369. <https://doi.org/10.3233/JAD-2008-13405>
236. Schwank, G., Koo, B. K., Sasselli, V., Dekkers, J. F., Heo, I., Demircan, T., Sasaki, N., Boymans, S., Cuppen, E., van der Ent, C. K., Nieuwenhuis, E. E. S., Beekman, J. M., & Clevers, H. (2013). Functional repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in intestinal stem cell organoids of cystic fibrosis patients. *\*Cell Stem Cell\**, 13(6), 653–658. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2013.11.002>
237. Schwartz, M. P., Hou, Z., Propson, N. E., Zhang, J., Engstrom, C. J., Santos Costa, V., et al. (2015). Human pluripotent stem cell-derived neural constructs for predicting neural toxicity. *\*Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America\**, 112(39), 12516–12521. <https://doi.org/10.1073/pnas.1516645112>
238. Seeman, P., & Madras, B. (Eds.). (2013). *\*Imaging of the Human Brain in Health and Disease\**. Elsevier.
239. Sevigny, J., et al. (2016). The antibody aducanumab reduces A $\beta$  plaques in Alzheimer's disease. *\*Nature\**, 537, 50–56. <https://doi.org/10.1038/nature19323>
240. Sharon, G., Sampson, T. R., Geschwind, D. H., & Mazmanian, S. K. (2016). The central nervous system and the gut microbiome. *\*Cell\**, 167(7), 915–932. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.10.020>

241. Shashi, V., et al. (2014). The utility of the traditional medical genetics diagnostic evaluation in the context of next-generation sequencing for undiagnosed genetic disorders. *\*Genetics in Medicine\**, 16(3), 176–182. <https://doi.org/10.1038/gim.2013.141>
242. Shepherd, J. (2018). Ethical (and epistemological) issues regarding consciousness in cerebral organoids. *\*Journal of Medical Ethics\**, 44(9), 611–612. <https://doi.org/10.1136/medethics-2018-104778>
243. Shi, Y., Kirwan, P., Smith, J., Robinson, H. P. C., & Livesey, F. J. (2012). Human cerebral cortex development from pluripotent stem cells to functional excitatory synapses. *\*Nature Neuroscience\**, 15(4), 477–486. <https://doi.org/10.1038/nn.3031>
244. Simcock, G., Kildea, S., Elgbeili, G., Laplante, D. P., Cobham, V., & King, S. (2017). Prenatal maternal stress shapes children’s theory of mind: The QF2011 Queensland Flood Study. *\*Journal of Developmental Origins of Health and Disease\**, 8(4), 483–492. <https://doi.org/10.1017/s2040174417000186>
245. Sloan, S. A., Andersen, J., Pasca, A. M., Birey, F., & Pasca, S. P. (2018). Generation and assembly of human brain region-specific three-dimensional cultures. *\*Nature Protocols\**, 13(11), 2062–2085. <https://doi.org/10.1038/s41596-018-0032-7>
246. Smits, L. M., Reinhardt, L., Reinhardt, P., et al. (2019). Modeling Parkinson's disease in midbrain-like organoids. *\*NPJ Parkinson's Disease\**, 5, 5. <https://doi.org/10.1038/s41531-019-0078-4>
247. Smoller, J. W., Craddock, N., Kendler, K., Lee, P. H., Neale, B. M., Nurnberger, J. I., et al. (2013). Identification of risk loci with shared effects on five major psychiatric disorders: A genome-wide analysis. *\*The Lancet\**, 381(9875), 1371–1379. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)62129-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)62129-1)
248. Soden, S. E., et al. (2014). Effectiveness of exome and genome sequencing guided by acuity of illness for diagnosis of neurodevelopmental disorders. *\*Science Translational Medicine\**, 6(265), 265ra168. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3000775>
249. Sofroniew, M. V. (2015). Astrocyte barriers to neurotoxic inflammation. *\*Nature Reviews Neuroscience\**, 16(4), 249–263. <https://doi.org/10.1038/nrn3898>
250. Sogut, S., Zoroglu, S. S., Ozyurt, H., et al. (2003). Changes in nitric oxide levels and antioxidant activities may have a role in the pathophysiological mechanisms involved in autism. *\*Clinical Chemistry and Laboratory Medicine\**, 331(1), 111–117. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2002.12.010>
251. Solito, E., & Sastre, M. (2012). Microglia function in Alzheimer’s disease. *\*Frontiers in Pharmacology\**, 3, 14. <https://doi.org/10.3389/fphar.2012.00014>
252. Stan, A. D., Ghose, S., Gao, X.-M., Roberts, R. C., Lewis-Amezcu, K., Hatanpaa, K. J., et al. (2006). Human postmortem tissue: What quality markers matter? *\*Brain Research\**, 1123, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.09.025>
253. Stancu, I. C., Vasconcelos, B., Terwel, D., & Dewachter, I. (2014). Models of  $\beta$ -amyloid induced Tau-pathology: The long and “folded” road to understand the mechanism. *\*Molecular Neurodegeneration\**, 9, 51. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-9-51>
254. Sun, Y., & Ding, Q. (2017). Genome engineering of stem cell organoids for disease modeling. *\*Protein & Cell\**, 8(5), 315–327. <https://doi.org/10.1007/s13238-017-0181-0>

255. Suzuki, K., Sugihara, G., Ouchi, Y., Nakamura, K., Futatsubashi, M., Takebayashi, K., et al. (2013). Microglial activation in young adults with autism spectrum disorder. *\*JAMA Psychiatry\**, 70(1), 49–58. <https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2013.272>
256. Sweeney, M., Sagare, A., & Zlokovic, B. V. (2018). Blood-brain barrier breakdown in Alzheimer’s disease and other neurodegenerative disorders. *\*Nature Reviews Neurology\**, 14(2), 133–150. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2017.169>
257. Sweeney, M. D., Kisler, K., Montagne, A., Toga, A. W., & Zlokovic, B. V. (2018). The role of brain vasculature in neurodegenerative disorders. *\*Nature Neuroscience\**, 21(10), 1318–1331. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0234-x>
258. Takahashi, H., & Shibuya, M. (2005). The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *\*Clinical Science\**, 109(3), 227–241. <https://doi.org/10.1042/CS20050003>
259. Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., & Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *\*Cell\**, 131(5), 861–872. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.019>
260. Tao, Y., & Zhang, S. C. (2016). Neural subtype specification from human pluripotent stem cells. *\*Cell Stem Cell\**, 19(5), 573–586. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.07.011>
261. Tărlungeanu, D. C., & Novarino, G. (2018). Genomics in neurodevelopmental disorders: An avenue to personalized medicine. *\*Experimental & Molecular Medicine\**, 50(4), 1–7. <https://doi.org/10.1038/s12276-018-0129-7>
262. Taylor, J. P., Hardy, J., & Fischbeck, K. H. (2002). Toxic proteins in neurodegenerative disease. *\*Science\**, 296(5575), 1991–1995. <https://doi.org/10.1126/science.1074999>
263. Theoharides, T. C., Kavalioti, M., & Tsilioni, I. (2019). Mast cells, stress, fear, and autism spectrum disorder. *\*International Journal of Molecular Sciences\**, 20(15), 3611. <https://doi.org/10.3390/ijms20153611>
264. Theoharides, T. C., Stewart, J. M., Panagiotidou, S., & Melamed, I. (2016). Mast cells, brain inflammation, and autism. *\*European Journal of Pharmacology\**, 778, 96–102. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.03.086>
265. Theoharides, T. C., & Cochrane, D. E. (2004). Critical role of mast cells in inflammatory diseases and the effect of acute stress. *\*Journal of Neuroimmunology\**, 146(1-2), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2003.09.011>
266. Theoharides, T. C., et al. (2010). Mast cells and inflammation. *\*Biochimica et Biophysica Acta\**, 1822(1), 21–33. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2010.08.007>
267. Toledo, J. B., Arnold, S. E., Raible, K., Brettschneider, J., Xie, S. X., Grossman, M., et al. (2013). Contribution of cerebrovascular disease in autopsy-confirmed neurodegenerative disease cases in the National Alzheimer’s Coordinating Centre. *\*Brain\**, 136(9), 2697–2706. <https://doi.org/10.1093/brain/awt188>



268. Tran, N. Q. V., & Miyake, K. (2017). Neurodevelopmental disorders and environmental toxicants: Epigenetics as an underlying mechanism. *\*International Journal of Genomics\**, 2017, 1–23. <https://doi.org/10.1155/2017/7526592>
269. Trujillo, C. A., Gao, R., Negraes, P. D., Chaim, I. A., Domissy, A., Vandenberghe, M., Devor, A., Yeo, G. W., Voytek, B., & Muotri, A. R. (2018a). Nested oscillatory dynamics in cortical organoids model early human brain network development. *\*bioRxiv\**, 358622. <https://doi.org/10.1101/358622>
270. Trujillo, C. A., & Muotri, A. R. (2018b). Brain organoids and the study of neurodevelopment. *\*Trends in Molecular Medicine\**, 24(11), 982–990. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2018.09.005>
271. Tyszka, J. M., Kennedy, D. P., Paul, L. K., & Adolphs, R. (2014). Largely typical patterns of resting-state functional connectivity in high-functioning adults with autism. *\*Cerebral Cortex\**, 24(7), 1894–1905. <https://doi.org/10.1093/cercor/bht019>
272. Valiente, M., & Marín, O. (2010). Neuronal migration mechanisms in development and disease. *\*Current Opinion in Neurobiology\**, 20(1), 68–78. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2009.12.007>
273. van de Haar, H. J., Burgmans, S., Jansen, J. F. A., van Osch, M. J. P., van Buchem, M. A., Müller, M., et al. (2016). Blood-brain barrier leakage in patients with early Alzheimer disease. *\*Radiology\**, 281(2), 527–535. <https://doi.org/10.1148/radiol.2016160126>
274. Van der Flier, W. M., Pijnenburg, Y. A. L., Fox, N. C., & Scheltens, P. (2011). Early-onset versus late-onset Alzheimer’s disease: The case of the missing APOE  $\epsilon$ 4 allele. *\*Lancet Neurology\**, 10(3), 280–288. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(10\)70324-2](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(10)70324-2)
275. Vargas, D. L., Nascimbene, C., Krishnan, C., Zimmerman, A. W., & Pardo, C. A. (2005). Neuroglial activation and neuroinflammation in the brain of patients with autism. *\*Annals of Neurology\**, 57(3), 304. <https://doi.org/10.1002/ana.20321>
276. Verkhratsky, A., & Butt, A. M. (2013). *\*Glial physiology and pathophysiology\** (1st ed.). Wiley-Blackwell.
277. Verly, M., Verhoeven, J., Zink, I., Mantini, D., Oudenhove, L. V., Lagae, L., Sunaert, S., & Romme, N. (2013). Structural and functional underconnectivity as a negative predictor for language in autism. *\*Human Brain Mapping\**, 35(8), 3602–3615. <https://doi.org/10.1002/hbm.22246>
278. Villar-Piqué, A., Lopes da Fonseca, T., & Outeiro, T. F. (2016). Structure, function, and toxicity of alpha-synuclein: The Bermuda triangle in synucleinopathies. *\*Journal of Neurochemistry\**, 139(Suppl 1), 240–255. <https://doi.org/10.1111/jnc.13249>
279. Voineagu, I., Wang, X. C., Johnston, P., Lowe, J. K., Tian, Y., Horvath, S., et al. (2011). Transcriptomic analysis of autistic brain reveals convergent molecular pathology. *\*Nature\**, 474(7351), 380–384. <https://doi.org/10.1038/nature10110>
280. Waddington, S. N., Privolizzi, R., Karda, R., & O’Neill, H. C. (2016). A broad overview and review of CRISPR-Cas technology and stem cells. *\*Current Stem Cell Reports\**, 2(1), 9–20. <https://doi.org/10.1007/s40778-016-0037-5>
281. Wallach, T. E., & Bayrer, J. R. (2017). Intestinal organoids: New frontiers in the study of intestinal disease and physiology. *\*Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition\**, 64(2), 180–185. <https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000001411>

282. Wang, H. (2018). Modeling neurological diseases with human brain organoids. *\*Frontiers in Synaptic Neuroscience\**, 10, 15. <https://doi.org/10.3389/fnsyn.2018.00015>
283. Wang, J. D., Khafagy, E.-S., Khanafer, K., Takayama, S., & ElSayed, M. E. (2016). Organization of endothelial cells, pericytes, and astrocytes into a 3D microfluidic in vitro model of the blood-brain barrier. *\*Molecular Pharmaceutics\**, 13(3), 895–906. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.5b00829>
284. Wang, Y., Wang, L., Zhu, Y., & Qin, J. (2018). Human brain organoid-on-a-chip to model prenatal nicotine exposure. *\*Lab on a Chip\**, 18(6), 851–860. <https://doi.org/10.1039/C7LC01084B>
285. Warren, Z., McPheeters, M. L., Sathe, N., Foss-Feig, J. H., Glasser, A., & Veenstra-Vanderweele, J. (2011). A systematic review of early intensive intervention for autism spectrum disorders. *\*Pediatrics\**, 127(5), e1303–e1311. <https://doi.org/10.1542/peds.2011-0426>
286. Watanabe, K., et al. (2005). Directed differentiation of telencephalic precursors from embryonic stem cells. *\*Nature Neuroscience\**, 8(3), 288–296. <https://doi.org/10.1038/nn1425>
287. Watanabe, M., Buth, J. E., Vishlaghi, N., de la Torre-Ubieta, L., Taxidis, J., Khakh, B. S., Coppola, G., Pearson, C. A., Yamauchi, K., Gong, D., et al. (2017). Self-organized cerebral organoids with human-specific features predict effective drugs to combat Zika virus infection. *\*Cell Reports\**, 21(6), 517-532. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.10.001>
288. Wei, H. G., Zou, H., Sheikh, A. M., Malik, M., Dobkin, C., Brown, W. T., et al. (2011). IL-6 is increased in the cerebellum of autistic brain and alters neural cell adhesion, migration, and synaptic formation. *\*Journal of Neuroinflammation\**, 8, 52. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-8-52>
289. Werner, S., Vu, H. T., & Rink, J. C. (2017). Self-organization in development, regeneration, and organoids. *\*Current Opinion in Cell Biology\**, 44, 102–109. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2016.12.008>
290. Willsey, A. J., Sanders, S. J., Li, M., Dong, S., Tebbenkamp, A. T., Muhle, R. A., Reilly, S. K., Lin, L., Fertuzinhos, S., Miller, J. A., et al. (2013). Coexpression networks implicate human midfetal deep cortical projection neurons in the pathogenesis of autism. *\*Cell\**, 155(5), 997-1007. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.10.018>
291. Wimmer, R. A., Leopoldi, A., Aichinger, M., Wick, N., Hantusch, B., Novatchkova, M., Taubenschmid, J., Hämmerle, M., Esk, C., Bagley, J. A., et al. (2019). Human blood vessel organoids as a model of diabetic vasculopathy. *\*Nature\**, 565(7739), 505-510. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0806-8>
292. Wood, P. L. (2003). Roles of CNS macrophages in neurodegeneration. In P. L. Wood (Ed.), *\*Neuroinflammation: Mechanisms and management\** (2nd ed., pp. 3–27). Humana Press.
293. Wright, A. V., Nuñez, J. K., & Doudna, J. A. (2016). Biology and applications of CRISPR systems: Harnessing nature’s toolbox for genome engineering. *\*Cell\**, 164(1-2), 29–44. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.12.010>
294. Wyss-Coray, T., & Rogers, J. (2012). Inflammation in Alzheimer disease—a brief review of the basic science and clinical literature. *\*Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine\**, 2(1), a006346. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006346>



295. Yamazaki, Y., Zhao, N., Caulfield, T. R., Liu, C.-C., & Bu, G. (2019). Apolipoprotein E and Alzheimer disease: Pathobiology and targeting strategies. *\*Nature Reviews Neurology\**. <https://doi.org/10.1038/s41582-019-0228-7>
296. Yan, Y., Song, L., Bejoy, J., Zhao, J., Kanekiyo, T., Bu, G., Zhou, Y., & Li, Y. (2018). Modeling neurodegenerative microenvironment using cortical organoids derived from human stem cells. *\*Tissue Engineering Part A\**, 24(13-14), 1125-1137. <https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2017.0423>
297. Yan, H. H. N., Siu, H. C., Law, S., Ho, S. L., Yue, S. S. K., Tsui, W. Y., Chan, D., Chan, A. S., Ma, S., Lam, K. O., et al. (2018). A comprehensive human gastric cancer organoid biobank captures tumor subtype heterogeneity and enables therapeutic screening. *\*Cell Stem Cell\**, 23(6), 882-897.e11. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.09.002>
298. Yao, Y., Walsh, W. J., McGinnis, W. R., & Praticò, D. (2006). Altered vascular phenotype in autism: Correlation with oxidative stress. *\*Archives of Neurology\**, 63(8), 1161-1164. <https://doi.org/10.1001/archneur.63.8.1161>
299. Yasuhara, T., Shingo, T., & Date, I. (2004). The potential role of vascular endothelial growth factor in the central nervous system. *\*Reviews in Neuroscience\**, 15(3), 293-307. <https://doi.org/10.1515/REVNEURO.2004.15.3.293>
300. Ye, F., Kang, E., Yu, C., Qian, X., Jacob, F., Yu, C., et al. (2017). DISC1 regulates neurogenesis via modulating kinetochore attachment of Ndel1/Nde1 during mitosis. *\*Neuron\**, 96(5), 1041.e1045-1054.e1045. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.10.010>
301. Yin, X., Mead, B. E., Safaee, H., Langer, R., Karp, J. M., et al. (2016). Engineering stem cell organoids. *\*Cell Stem Cell\**, 18(1), 25-38. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.12.005>
302. Ying, Q.-L., Stavridis, M., Griffiths, D., Li, M., & Smith, A. (2003). Conversion of embryonic stem cells into neuroectodermal precursors in adherent monoculture. *\*Nature Biotechnology\**, 21(2), 183-186. <https://doi.org/10.1038/nbt0203-183>
303. Yoon, S. J., Elahi, L. S., Pasca, A. M., Marton, R. M., Gordon, A., Revah, O., Miura, Y., Walczak, E. M., Holdgate, G. M., Fan, H. C., Huguenard, J. R., Geschwind, D. H., & Pasca, S. P. (2019). Reliability of human cortical organoid generation. *\*Nature Methods\**, 16(1), 75-78. <https://doi.org/10.1038/s41592-018-0255-0>
304. Young, A. M., Chakrabarti, B., Roberts, D., Lai, M. C., Suckling, J., & Baron-Cohen, S. (2016). From molecules to neural morphology: Understanding neuroinflammation in autism spectrum condition. *\*Molecular Autism\**, 7, 9. <https://doi.org/10.1186/s13229-016-0074-1>
305. Yu, J., Vodyanik, M. A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J. L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G. A., Ruotti, V., Stewart, R., et al. (2008). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *\*Science\**, 318(5858), 1917-1920. <https://doi.org/10.1126/science.1151526>
306. Yuen, R. K., et al. (2015). Whole-genome sequencing of quartet families with autism spectrum disorder. *\*Nature Medicine\**, 21(2), 185-191. <https://doi.org/10.1038/nm.3804>
307. Zamolodchikov, D., Chen, Z. L., Conti, B. A., Renné, T., & Strickland, S. (2015). Activation of the factor XII-driven contact system in Alzheimer's disease patient and mouse model plasma. *\*Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America\**, 112(13), 4068-4073. <https://doi.org/10.1073/pnas.1421648112>



308. Zhan, Y., Paolicelli, R. C., Sforzini, F., Weinhard, L., & Bolasco, G. (2014). Deficient neuron-microglia signalling results in impaired functional brain connectivity and social behavior. *Nature Neuroscience*, 17(3), 400–406. <https://doi.org/10.1038/nn.3641>
309. Zhang, S.-C., Wernig, M., Duncan, I. D., Brüstle, O., & Thomson, J. A. (2001). In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells. *Nature Biotechnology*, 19(12), 1129–1133. <https://doi.org/10.1038/nbt1201-1129>
310. Zhao, J., O'Connor, T., & Vassar, R. (2011). The contribution of activated astrocytes to A $\beta$  production: Implications for Alzheimer's disease pathogenesis. *Journal of Neuroinflammation*, 8, 150. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-8-150>
311. Zhao, Z., Nelson, A. R., Betsholtz, C., & Zlokovic, B. V. (2015). Establishment and dysfunction of the blood-brain barrier. *Cell*, 163(5), 1064–1078. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.10.018>
312. Zhu, Y., Wang, L., Yin, F., Yu, Y., Wang, Y., Shepard, M. J., et al. (2017). Probing impaired neurogenesis in human brain organoids exposed to alcohol. *Integrative Biology*, 9(10), 968–978. <https://doi.org/10.1039/c7ib00105c>
313. Zielinski, B. A., Prigge, M. B. D., Nielsen, J. A., Froehlich, A. L., Abildskov, T. J., Anderson, J. S., Fletcher, P. T., Zygumunt, K. M., Travers, B. G., Lange, N., et al. (2014). Longitudinal changes in cortical thickness in autism and typical development. *Brain*, 137(6), 1799–1812. <https://doi.org/10.1093/brain/awu061>
314. Zimprich, A., et al. (2004). Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant Parkinsonism with pleomorphic pathology. *Neuron*, 44(4), 601–607. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.10.021>