Karina Griesi Oliveira

Identificação de genes e vias associadas aos
transtornos do espectro autista

Identification of genes and pathways associated to autism
spectrum disorders

São Paulo

2011

Karina Griesi Oliveira

Identificação de genes e vias associadas aos transtornos do espectro autista

Identification of genes and pathways associated to autism spectrum disorders

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção de Título de Doutor em Ciências, na Área de Biologia/Genética.

Orientador(a): Maria Rita dos Santos e Passos Bueno

São Paulo

2011

Ficha Catalográfica

Griesi-Oliveira, Karina

Identificação de genes e vias
associadas aos transtornos do espectro
autista

Número de páginas: 135

Tese (Doutorado) - Instituto de
Biociências da Universidade de São Paulo.
Departamento de Genética e Biologia
evolutiva.

1. Genética do autismo 2. TRPC6 3.
Estudos citogenéticos 4. Estudos de
expressão

I. Universidade de São Paulo. Instituto de
Biociências. Departamento Genética e
Biologia evolutiva.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a). Maria Rita Passos Bueno
Orientador(a)

A todos os autistas, representados na pessoa de Bruna, a primeira criança autista que conheci.

A ela, que certamente foi quem plantou a semente da curiosidade que me fez querer mergulhar no estudo desta intrigante condição.

AGRADECIMENTOS

O estudo descrito a seguir foi resultado de 27 anos de trabalho e dedicação de muitos.

Dedicação de Vânia e Antônio que, em Outubro de 1983, ainda pais de primeira viagem, se viram diante da responsabilidade de criar e educar uma nova pessoa que havia chegado ao mundo. O trabalho deles não deve ser julgado pelo seu resultado, mas sim pelo amor nele depositado, que foi imensurável. Obrigada, pai e mãe, por me ensinarem que o amor ao próximo é o valor mais importante da vida, por compartilharem dos meus sonhos e por me apoiarem incondicionalmente em todas as escolhas que fiz no meu caminho.

Dedicação de Orlando e Alzira, meus avós, que devotaram anos de suas vidas para cuidar de mim, e hoje ainda o fazem. Agradeço-os por todo o carinho e por terem sido peças fundamentais na minha formação. Ao lado deles se dedicaram também todos os membros da minha família, cujos nomes aqui não caberiam. Obrigada, a todos, pelo amor e apoio sempre.

Dedicação também de todos os professores, do jardim de infância à faculdade, que me ensinaram do bê-a-bá às leis de Mendel. O meu agradecimento especial àqueles que fizeram eu me apaixonar por esta ciência fascinante que é a Biologia.

Este estudo, porém, foi fruto diretamente do trabalho e dedicação da incansável Dra. Maria Rita, minha orientadora e meu exemplo de profissional e de caráter no meio científico. Obrigada, Rita, por ter me acolhido em seu laboratório, nos idos de 2004, quando eu ainda era uma aluna de graduação sem qualquer experiência, insistindo para trabalhar com autismo. Obrigada por ter me proporcionado vivenciar as tantas discussões científicas que me tornaram a profissional que sou hoje e por me apoiar sempre nos rumos que tomamos ao longo deste estudo. Aproveito para agradecer neste parágrafo ao Dr. Matthew State e ao Dr. Alysson Muotri que me abriram as portas de seus laboratórios em Yale e na UCSD, respectivamente, apostando no sucesso deste estudo. Agradeço também, a todos os médicos e psicólogos que colaboraram com este trabalho, diagnosticando e encaminhando pacientes para o Centro de Estudos do Genoma Humano.

Estas páginas também não teriam sido escritas se não fosse a dedicação de todos os meus amigos. Meu muito obrigado primeiramente aos meus amigos do lab Rita,

não só por contribuírem para minha formação científica mas também por sua alegria e descontração que tornam nosso laboratório um lugar maravilhoso de se trabalhar! A todos os amigos que fiz pela vida, pelas risadas e pelo conforto oferecido nos momentos difíceis, em especial a Jacqueline Oseki, Suellen Maia e Carol e Gabriela Tavares (e toda sua família, que me acolhe como uma filha). Um agradecimento especial também aos amigos que fiz no Muotri's Lab, Miguel Mitne, Paulo André Marinho, Cassiano Carromeu e Luciana Andrade, que foram minha família em San Diego, com quem compartilhei muitos momentos de alegria, mas que se fizeram presentes especialmente nos momentos de saudade e desânimo.

Este trabalho contou ainda com a colaboração e dedicação de todos os membros do corpo técnico e científico do Centro de Estudos do Genoma Humano. A todos eles, meu profundo agradecimento. Agradeço ainda a todos os funcionários da Secretaria de Pós-Graduação e da Secretaria do Departamento de Genética e Biologia Evolutiva que me auxiliaram com os processos burocráticos do programa de pós-graduação.

Apesar do trabalho e dedicação de todas estas pessoas, este estudo nunca teria sido possível se não fosse a contribuição de todas as famílias e pacientes autistas que depositam sua esperança em nossa equipe. Obrigada pela confiança e este trabalho não tem objetivo maior senão o de contribuir para o bem estar dessas crianças.

Enfim, depois de 27 anos de esforços conjuntos, eis aqui esta tese de doutorado que, apesar de ser uma única gota no vasto oceano a ser explorado do conhecimento, eu espero contribuir para o progresso da ciência e para o entendimento dos transtornos do espectro autista.

NOTA DA AUTORA

Esta tese de doutorado compreende um trabalho inédito desenvolvido durante os anos de 2006 a 2011 no Laboratório de Genética do Desenvolvimento do Centro de Estudos do Genoma Humano do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (CEGH/IB-USP).

A apresentação do trabalho seguiu o modelo de divisão em capítulos/artigos, modelo este aceito atualmente pelos programas de pós-graduação do Instituto de Biociências. Dessa maneira, são apresentados apenas os estudos que resultaram em artigos científicos, os quais serão submetidos a publicação em breve e, assim, optei por redigí-los em inglês. As seções referentes a introdução, material e métodos e discussão geral estão escritas em português, conforme especificado pelas regras deste Instituto.

Embora o novo acordo ortográfico da língua portuguesa esteja em vigência desde Janeiro de 2009, ficou estabelecido um período de transição até 2012, durante o qual são válidas tanto a regra nova quanto a antiga. Sendo assim, optei por utilizar as normas antigas, mantendo o uso de crases, das regras de acentuação anteriores e uso de trema.

As referências bibliográficas referentes a cada um dos artigos estão relacionadas ao final dos mesmos. Já as referências bibliográficas que constam na introdução, material e métodos e discussão encontram-se ao final da tese.

Em anexo a este trabalho encontra-se um estudos que por hora não será submetidos a publicação. Trata-se de um estudo da casuística dos pacientes atendidos no CEGH-IB/USP até Julho de 2008, apresentado na conferência “VII São Paulo Research Conferences - Cérebro e Pensamento”, na forma de pôster. Todavia, uma atualização dos dados está sendo realizada pela aluna Danielle de Paula Moreira e só então o trabalho será submetido a publicação. Por fim, ainda encontra-se como anexo, o protocolo detalhado da técnica de obtenção de células-tronco pluripotente induzidas (iPSC), a qual ainda está em fase de implantação no CEGH.

ÍNDICE

Resumo	
Abstract	
Capítulo 1. Introdução Geral e Objetivos	01
1.1 Aspectos clínicos dos transtornos do espectro autista	01
1.2 Aspectos genéticos dos transtornos do espectro autista	03
1.3 Estudos citogenéticos	04
1.4 Estudos de expressão gênica	06
1.5 Uso de células-tronco pluripotentes para a modelagem <i>in vitro</i> de doenças neurológicas	09
1.6 Objetivos	11
Capítulo 2. Material e Métodos	13
Capítulo 3. A de novo balanced translocation (2:X)(q11.2;q22) and maternal isodisomy on chromosome 5 associated with autism disorder	29
Capítulo 4. Identification of TRPC6 gene, a Ca ²⁺ ion channel, as a novel candidate gene for autism and modeling neuronal development in vitro using patient's cells	46
Capítulo 5. Expression analysis in dental pulp stem cells of idiopathic autistic patients reveals alterations in important processes for neurogenesis	83
Capítulo 6. Discussão Geral e Conclusões	112
Referências Bibliográficas	116
Anexos	123

RESUMO

Os transtornos do espectro autista (TEA) são um grupo de doenças neuropsiquiátricas caracterizadas por um prejuízo na capacidade de comunicação e de interação social e por padrões comportamentais estereotipados. Os TEA são geneticamente heterogêneos o que dificulta a identificação das alterações genéticas que estão contribuindo para estes transtornos. No presente estudo, selecionamos como uma primeira abordagem o estudo de translocações cromossômicas, buscando encontrar genes candidatos para posteriores estudos funcionais. No primeiro caso, uma translocação *de novo* balanceada envolvendo os cromossomos 2q11 e Xq24, não identificamos nenhum candidato funcional rompido pelos pontos de quebra. Detectamos ainda a presença de uma isodissomia materna do cromossomo 5 nesta paciente. Este resultado sugere que, possivelmente, tanto a translocação cromossômica quanto a isodissomia devem estar contribuindo para a etiologia do TEA nesta paciente, caracterizando este como um caso de efeito poligênico. Já o estudo da translocação *de novo* balanceada (3,11)(p21,q22) revelou que o gene *TRPC6*, um canal de cálcio envolvido no desenvolvimento de dendritos e sinapses excitatórias, encontrava-se rompido no cromossomo 11 deste paciente. As análises dos neurônios e células progenitoras neurais deste paciente obtidas através da técnica de reprogramação celular e o estudo global de expressão gênica sugerem fortemente que o rompimento do gene *TRPC6* é o fator etiológico do TEA neste caso. Por fim, nós também realizamos um estudo de expressão gênica global de pacientes autistas idiopáticos e verificamos que os genes diferencialmente expressos nestes pacientes estão principalmente envolvidos na regulação da dinâmica do citoesqueleto, indicando que este pode ser o processo biológico comumente afetado nos pacientes autistas. Nosso trabalho mostra que os estudos citogenéticos são importantes para a identificação de genes candidatos para os TEA e reforça a hipótese de que estes transtornos são causados por diferentes variantes genéticas mas que levam ao comprometimento de um processo biológico comum. Acreditamos que o modelo de reprogramação celular contribuirá para o entendimento da implicação de tais processos na etiologia dos TEA.

ABSTRACT

Autism spectrum disorders (ASD) are a group of neurodevelopmental diseases characterized by impairments in social and communicative skills and repetitive behaviors. The investigation of ASD causes is hampered by the genetic heterogeneity of these neurodevelopmental diseases. In the present study, we mapped the breakpoints associated to chromosomal translocations found in two autistic patients as a first screening approach, trying to identify single candidate genes that could be further investigated by functional analysis. In the first case, a *de novo* balanced translocation involving the chromosomes 2q11 and Xq24, we did not find any functionally known relevant gene disrupted by the breakpoints but, surprisingly, SNP-array data showed that the patient also presents a maternally inherited isodisomy on chromosome 5. In this case, is possible that ASD is caused by the combination of the molecular results caused by the translocation and the UPD on chromosome 5, which would characterize this case as an example of polygenic effects on ASD etiology. On the other hand, the study of a second case, a boy with a *de novo* balanced translocation (3;11)(p21;q22), revealed that *TRPC6*, a calcium channel involved in dendritic spine and excitatory synapse formation, was disrupted by the translocation on chromosome 11. Making use of cellular reprogramming to generate neurons and neuronal progenitor cells from this patient and expression analysis, we demonstrated that *TRPC6* disruption can respond for the phenotype seen in this patient. Finally, we also performed a genome-wide expression analysis to investigate idiopathic autistic patients and we verified that ASD DEGs are mainly implicated in cytoskeleton dynamics, suggesting that the regulation of this cellular structure can be one of the common mechanisms of ASD etiology. Our work shows that cytogenetic studies are important for the identification of ASD candidate genes and reinforces the hypothesis that these disorders are caused by different genetic variants that are implicated in a common biological process. We believe that cellular reprogramming will contribute for the understanding of the implication of such biological processes in the etiology of ASD.

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO GERAL E OBJETIVOS

1.1 ASPECTOS CLÍNICOS E EPIDEMIOLÓGICOS DOS TRANSTORNOS DO ESPECTRO

AUTISTA

O autismo é um transtorno neuropsiquiátrico grave definido por um conjunto de manifestações clínicas que incluem alterações na capacidade de comunicação e de interação social recíproca além de padrões comportamentais estereotipados e repetitivos, sendo pelo menos uma destas manifestações evidenciada até os três anos de idade. O grau de comprometimento que os indivíduos apresentam com relação a cada um desses aspectos é bastante variado e outras manifestações clínicas, tais como comportamento auto e hetero agressivo, anomalias no sono e alimentação, hiperatividade e ansiedade também podem estar presentes (American Psychiatric Association, 1994; Maestrini et al., 2000; Folstein & Rosen-Sheidley, 2001).

O diagnóstico de autismo é realizado com base nos critérios do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-IV, American Psychiatric Association, 1994), segundo o qual está classificado dentro dos transtornos invasivos do desenvolvimento (TID). Dentre os TID ainda estão inclusos a Síndrome de Rett, a Síndrome de Asperger, o transtorno desintegrativo da infância e os transtornos invasivos do desenvolvimento sem outra especificação (*Pervasive Developmental Disorder not otherwise specified* - PDDNOS).

Devido a sobreposição clínica existente entre o autismo, a Síndrome de Asperger e o PDDNOS, tornou-se comum o uso do termo “Transtornos do Espectro Autista” (TEA), ou o termo em inglês, “*Autism Spectrum Disorders*” (ASD) para se referir a estas três categorias de TIDs (Veenstra-VanderWeele & Cook, 2004). O transtorno de Asperger encontra-se no extremo mais leve de manifestações dos TEA e difere das demais categorias principalmente pela ausência de atraso na comunicação verbal e por não haver prejuízo significativo do desenvolvimento cognitivo (Gilberg, 1998a). Já a categoria de PDDNOS é aplicada nos casos em que os critérios para o diagnóstico de transtorno autista não são satisfeitos em vista de seu início tardio ou sintomatologia atípica.

As principais estruturas do sistema nervoso central nas quais foram descritas alterações anatômicas e/ou funcionais relacionadas com o autismo são a amígdala (Howard et al., 2000; Aylward et al., 1999; Pierce et al., 2001; Abell et al., 1999), o

hipocampo (Raymond et al., 1996, Sparks et al., 2002) e o cerebelo (Sparks et al., 2002; Ritvo et al., 1986; Bauman and Kemper, 1985). Além disso, pelo menos 20 casos de autópsia revelaram redução no número de células de Purkinje no cerebelo de pacientes com autismo (Ritvo et al., 1986; Courchesne, 1997; Bailey et al., 1998b; Fatemi et al., 2002). Contudo, estas alterações não estão presentes em todos os pacientes e, assim, não são suficientes para serem usadas como ferramentas no diagnóstico.

Com base em uma recente revisão de Eric Fombonne (2009), a prevalência estimada para os TEA é de 6,37/1000. Quando o transtorno autista é considerado isoladamente, o estudo aponta uma prevalência de cerca de 2 casos para cada 1000 indivíduos, com uma razão sexual entre homens e mulheres de 4,2/1. A prevalência de casos de PDDNOS é a mais alta dentre os TIDs, estimada em 3,71/1000, e a de Síndrome de Asperger é a mais baixa, calculada em 0,6/1000. A estimativa de prevalência destes transtornos têm crescido ao longo dos últimos 20 anos e na mesma revisão citada acima, Fombonne também discute as possíveis causas para este fato. O autor destaca como principais fatores: a ampliação da definição dos TEA, ou seja, a inclusão de indivíduos com graus de acometimento bem mais leves nesta contabilização; mudanças no conceito diagnóstico, fazendo com que indivíduos anteriormente diagnosticados com outras condições, tal como retardo mental, sejam agora diagnosticados dentro dos TEA; o aumento na disponibilidade de serviços de saúde e de educação especializados; aumento de estudos cuja metodologia se baseia em uma triagem ativa da população em busca de casos destes transtornos e não uma busca passiva; e a maior conscientização e conhecimento sobre esta condição, tornando mais sensível a identificação de indivíduos afetados.

A prevalência estimada dos TEA no Brasil foi calculada em 2,72/1000 em um estudo recente realizado em uma cidade do estado de São Paulo (Paula et al., 2011). Os autores discutem que a frequência menor encontrada neste estudo, comparado com a prevalência média das TEA estimadas em outros trabalhos, pode se dever a uma menor conscientização da população local acerca destes transtornos, diagnósticos incorretos e falta de sistemas de registro de casos.

1.2 ASPECTOS GENÉTICOS DOS TRANSTORNOS DO ESPECTRO AUTISTA

A maioria dos casos de TEA são idiopáticos, ou seja, não possuem causa conhecida. Acredita-se que fatores ambientais possam estar envolvidos na determinação da doença como infecções virais, exposição a drogas teratogênicas ou outras complicações durante a gestação, embora nenhuma relação causal entre estes fatores e o autismo tenha sido ainda demonstrada (Chess et al., 1971; Deb et al., 1997; Gillberg & Coleman, 2000; Juul-Dam et al., 2001; Zwaigenbaum et al., 2002).

Por outro lado, existem fortes evidências de que fatores genéticos são determinantes para a etiologia destes transtornos. Baseando-se nos dados de concordância entre pares de gêmeos monozigóticos (60-90%) e na taxa de recorrência em irmãos de indivíduos afetados (2-8%), estima-se que a herdabilidade para estes transtornos seja maior do que 90% (Folstein & Rutter, 1977; Steffenburg et al., 1989; Bailey et al., 1995; Muhle, 2004). Além disso, cerca de 10% dos casos estão associados a doenças de herança monogênica como esclerose tuberosa, síndrome do X-frágil e neurofibromatose (Folstein & Rosen-Sheidley, 2001), e em aproximadamente 3% dos casos, os indivíduos possuem alguma anomalia cromossômica detectável por cariótipo (Vorstman et al., 2006).

O baixo grau de adaptabilidade dos indivíduos portadores em contraste com a sua alta frequência na população são os aspectos fundamentais que norteiam a definição dos modelos de herança para os TEA. Até a década passada, acreditava-se que a maioria dos casos de autismo seguiam um modelo multifatorial ou poligênico de herança: o fenótipo seria resultado da combinação de diversas variantes alélicas de pequeno efeito somadas ou não a fatores ambientais. Isto explicaria a alta frequência do transtorno, uma vez que variantes de pequeno efeito estão sujeitas a uma menor pressão seletiva e, dessa forma, podem se tornar frequentes na população. No entanto, o número crescente de mutações patogênicas e de variações de número de cópias especialmente em genes de relevância funcional para o fenótipo que têm sido encontradas em pacientes autistas sugerem que, na verdade, uma parcela maior do que se previa dos casos deva ser explicada por modelos monogênicos, seja por herança diretamente de um alelo causador ou mutações *de novo*. Nesta situação, as variantes alélicas associadas a doença seriam de alto efeito e, portanto, mais raras na população. O que explicaria a alta frequência dos TEA neste caso seria a existência de diferentes alterações individualmente raras em um mesmo gene (heterogeneidade alélica) ou em genes diferentes (heterogeneidade de locus), causando o mesmo fenótipo. Dessa forma, os TEA são considerados uma doença

complexa, pois se acredita que possam se enquadrar em diferentes modelos de herança (para uma discussão mais aprofundada sobre este assunto, veja a referência El-Fishawy & State, 2010).

As estratégias mais utilizadas para investigar variantes comuns associadas aos TEA são os estudos de ligação e de associação. Através dos estudos de ligação já foram identificadas diversas regiões candidatas para autismo, porém, com exceção das regiões 2q e 7q, há pouca sobreposição dos loci quando os diferentes estudos são comparados (Bartlett et al., 2005; Molloy et al., 2005).

Pouca replicação de resultados existe também quando se consideram os estudos de associação já realizados para autismo. Um dos poucos casos de replicação de resultado que chama atenção é do gene *CNTNAP2* (contactin associated protein 2), para o qual foi detectada associação positiva por 3 estudos diferentes (Alarcón et al., 2008; Arking et al., 2008; Vernes et al., 2008). O gene *CNTNAP2* codifica uma molécula de adesão neuronal que faz parte da família das neurexinas, as quais são responsáveis pela interação entre neurônios e glia durante o desenvolvimento do SNC. O uso de microarranjos de polimorfismos de base única (ou em inglês, *SNP-based microarray*) têm facilitado muito os estudos de associação, uma vez que com esta técnica é possível analisar o genoma todo e não apenas um gene alvo. Porém, apesar dos resultados das análises de associação global estarem reforçando a importância das variantes comuns para os TEA, elas têm mostrado que o risco que cada uma destas variantes confere a estes transtornos é baixo e dificilmente explicam a alta herdabilidade descrita para o ASD (El-Fishawy & State, 2010).

Outras estratégias importantes para a investigação de genes candidatos aos TEA são os estudos citogenéticos, que visam identificar variantes raras, e os estudos de expressão, que por sua vez, são úteis na identificação de vias biológicas comprometidas nestes transtornos. Estas estratégias estão descritas em maiores detalhes a seguir.

1.3 ESTUDOS CITOGENÉTICOS

Alterações citogenéticas, ou seja, translocações, inversões, deleções e duplicações, podem levar a alterações funcionais de genes de diversas formas. Primeiramente, modificações no número de cópias causadas por deleções ou duplicações podem causar problemas relacionados à dosagem de genes. Deleções

podem ainda levar a exclusão de uma cópia normal de um gene, desmascarando um alelo que contenha uma mutação. Por sua vez, pontos de quebra causados por translocações e inversões podem levar ao rompimento de um gene ou à separação deste de sua sequência regulatória.

Anomalias cromossômicas em indivíduos com TEA detectáveis por cariótipo já foram descritas em quase todos os cromossomos e todas as regiões envolvidas nestas alterações são tidas como candidatas a conter genes de susceptibilidade a estes transtornos. Em 2006, Vorstman e colaboradores revisaram os dados de inúmeros casos de alterações cromossômicas em pacientes autistas relatados na literatura. O estudo mostrou que muitas das regiões envolvidas nestas alterações cromossômicas se sobrepõem a loci já identificados por estudos de ligação e associação. Além disso, observou-se também grande recorrência de alterações nas regiões 2q37, 5p15, 11q25, 16q22.3, 17p11.2, 18q21.1, 18q23, 22q11.2, 22q13.3 e Xp22.2–p22.3, apontando estes como novos loci de susceptibilidade aos TEA.

Como citado anteriormente, estima-se que 3% dos indivíduos autistas apresentam alterações cromossômicas detectáveis por cariótipo. Porém, técnicas modernas de análises genômicas têm possibilitado a identificação de pequenas deleções ou duplicações não vistas por cariótipo, as chamadas “CNVs”, do inglês “*copy number variations*”. Com o uso destas técnicas, chamadas de array de SNPs (já citado anteriormente) e array CGH (do inglês “*Array Comparative Genomic Hybridization*”), CNVs raras foram identificadas em aproximadamente 10% dos casos esporádicos de autismo, uma porcentagem muito maior do que a identificada em controles, a qual foi de 1% (Sebat et al., 2007). Além disso, comparando-se pacientes e controles, verificou-se que, em autistas, uma maior parcela destas CNVs raras afeta genes (Pinto et al., 2010). Outro dado interessante é a proporção entre homens e mulheres dentre os pacientes portadores de CNVs raras, que é de 2:1, acentuadamente reduzida com relação à razão sexual observada de 4:1 quando considerada a amostra como um todo (Marshall et al., 2008; Sebat et al., 2007). Este dado sugere que as CNVs tem uma penetrância alta, contribuindo para o fenótipo de maneira mais igualitária tanto em homens quanto em mulheres. Dentre as alterações de número de cópias que têm sido encontradas com maior frequência em pacientes com TEA, encontram-se uma microdeleção de aproximadamente 500kb na região 16p11.2 (cerca de 1% dos casos), e as regiões

15q11-q13 e 22q11.3 (Kusenda & Sebat, 2008). Nesta última, está localizado o gene *SHANK3*. CNVs envolvendo os genes *SHANK3* e *NRXN1* foram identificadas em mais de um estudo com pacientes autistas (Marshall et al., 2008; Sebat et al., 2007; Szatmari et al., 2007). *SHANK3* e *NRXN1* codificam moléculas de adesão neuronais importantes para os processos de maturação sináptica e mutações de ponto nestes genes também já foram identificadas em pacientes autistas (Durand et al., 2007; Kim et al., 2008).

Análises das funções biológicas dos genes envolvidos em CNVs identificadas em pacientes com TEA têm mostrado um enriquecimento de genes ligados ao desenvolvimento do sistema nervoso central, como genes relacionados a funções sinápticas, de neurotransmissão e crescimento e direcionamento axonal (Gai et al., 2011; Sbacchi et al., 2010).

Estes achados têm reforçado a hipótese de que uma quantidade substancial dos casos de autismo pode ser causada por rearranjos cromossômicos e demonstram a importância dos estudos citogenéticos para a identificação de genes associados aos TEA.

1.4 ESTUDOS DE EXPRESSÃO GÊNICA

Uma abordagem que tem se mostrado muito interessante para identificação de genes e vias relacionados a doenças psiquiátricas são os estudos de expressão gênica, especialmente após o desenvolvimento da técnica de microarranjos de DNA (ou em inglês, DNA *microarrays*). Esta técnica passou a permitir a avaliação da expressão de uma vasta quantidade de transcritos em um único experimento, possibilitando uma análise global do transcriptoma de um tecido em um momento particular e, portanto, abrindo perspectivas para a identificação de vias importantes para os TEA.

O estudo de Baron e colaboradores (2006) revelou que genes relacionados à resposta imune e genes que interagem com norepinefrina têm uma expressão diferencial em autistas. Já outro estudo, o qual comparou o perfil de expressão de células de linhagem linfoblástica de três pares de gêmeos discordantes para o autismo, revelou a expressão diferencial de genes relacionados a funções neurológicas e ao desenvolvimento do sistema nervoso central (Hu et al., 2006).

Nishimura e colaboradores (2007) estudaram autistas de dois grupos etiológicos diferentes: oito autistas com Síndrome do X-Frágil e sete autistas com duplicação no cromossomo 15q. Os estudos de expressão mostraram uma distinção entre estes dois

grupos com base nos genes diferencialmente expressos. Neste mesmo trabalho foi visto que o gene *CYFIP1*, que apresentou uma expressão aumentada em autistas com dup15q, interage com o *FMRI*, gene mutado na Síndrome do X-Frágil, demonstrando que alterações em genes distintos, mas de uma mesma via, podem levar ao mesmo fenótipo. Além disso, os genes *JAKMIP1* e *GPR155*, genes regulados por *FMRI* e *CYFIP1*, apresentam expressão diferencial entre um irmão afetado e outro não afetado por autismo idiopático.

No trabalho de Gregg e colaboradores (2008) foram comparados autistas com e sem regressão. A análise de agrupamento separou estes dois grupos, mostrando que possivelmente eles possuem etiologias distintas. Além disso, grande parte dos genes identificados como diferencialmente expressos estão ligados a resposta imune como nos estudos de Baron e colaboradores (2006).

A comparação do perfil de expressão de 20 pares de irmãos discordantes para autismo mostrou o envolvimento de genes relacionados ao metabolismo do colesterol e biossíntese de andrógenos (Hu et al., 2009a). Este é um fato interessante uma vez que é sabido que andrógenos têm papel na plasticidade neural e pode explicar a diferença na razão de indivíduos do sexo masculino e feminino afetados pela doença. Em outro trabalho, o mesmo grupo comparou o perfil de expressão de 116 pacientes com TEA, divididos em três subgrupos de acordo com a gravidade do fenótipo, com o perfil de expressão de controles não autistas pareados por idade (Hu et al., 2009b). Dentre os genes diferencialmente expressos entre autistas e controles, foram encontrados genes relacionados à regulação do ciclo circadiano e genes associados à insensibilidade a andrógenos, reforçando os resultados do trabalho anterior. Quando cada um dos três diferentes subgrupos fenotípicos é comparado aos controles normais, 20 genes em comum às três análises são identificados como diferencialmente expressos com relação aos controles, mas também são encontrados muitos outros genes diferencialmente expressos exclusivos de cada subgrupo. Este resultado mostra que existem alterações biológicas comuns entre os subgrupos, mas também há desregulações específicas que devem responder pelas diferenças na gravidade do transtorno. Dentre os 20 genes em comum aos três grupos, encontram-se genes que estão envolvidos com direcionamento axonal, como *RHOA* e *SLIT2* e processos inflamatórios, como *ITGAM*. Estas mesmas vias também foram identificadas como associadas ao autismo no primeiro trabalho do grupo (Hu et al., 2006).

Apesar dos estudos de expressão gênica não terem identificado mesmas vias, processos ou genes consistentemente associados ao autismo, todos mostram que os pacientes autistas possuem um perfil de expressão diferencial quando comparado a controles.

Embora fosse mais interessante realizar os estudos de expressão em autismo com linhagens neuronais, a dificuldade de obtenção destas células leva à necessidade do uso de tipos celulares mais acessíveis. Todos os estudos de expressão realizados até o momento em autismo utilizaram linfócitos ou linhagens linfoblastóides, baseados em trabalhos que mostram que os perfis de expressão de linfócitos e do tecido nervoso são comparáveis (Sullivan et al., 2006).

Outro possível bom material para estudo de expressão em autismo são as células-tronco. As células-tronco mesenquimais, em particular, podem ser isoladas de vários tecidos como medula óssea, periósteo, osso trabecular, tecido adiposo, músculo esquelético e polpa de dentes. A utilização de células-tronco obtidas a partir da polpa de dentes (*Dental pulp stem cells* – DPSC) é bastante interessante do ponto de vista ético, pois os procedimentos odontológicos são realizados de acordo com a necessidade dos pacientes, independentemente de sua posterior utilização para obtenção de células-tronco, e sua utilização depende apenas da autorização dos pacientes ou responsáveis. Além disso, as DPSCs também tem uma origem ectodérmica como o tecido nervoso (d'Aquino et al. 2009). Após se submeter tais células a um processo de diferenciação, estas apresentam a expressão de marcadores específicos que indicam maturação neuronal, mostrando que as DPSCs são capazes de se transformar em linhagens neuronais (Kadar et al. 2009). Porém, embora tenha sido demonstrada atividade funcional de canais de potássio e sódio controlados por voltagem nos neurônios obtidos a partir de DPSC, este dado não tem sido consistentemente replicado¹. Ainda assim, as DPSCs se mostram como um bom material de estudos para os TEA visto a sua facilidade de obtenção e expansão em cultura, bem como pela sua relação com o tecido nervoso.

¹ Comunicação pessoal de Estela Cruvinel, em agosto de 2009.

1.5 USO DE CÉLULAS-TRONCO PLURIPOTENTE INDUZIDAS PARA MODELAGEM *IN VITRO* DE DOENÇAS NEUROLÓGICAS

Recentemente, descobriu-se que através da super expressão de genes específicos é possível reprogramar células somáticas para um estado pluripotente, gerando as células-tronco pluripotente induzidas, ou em inglês, *induced pluripotent stem cells* – iPSC (Takahashi et al., 2007; Yu et al., 2008). As células iPSC resultantes desse processo são isogênicas com relação ao indivíduo doador, ou seja, carregam exatamente a mesma informação genética da células doadoras, e têm o potencial de se transformar em tipos celulares dos três diferentes tecidos embrionários. Isto é especialmente relevante no estudo de doenças para as quais não existem modelos animais adequados ou quando obtenção do tipo celular envolvido na patologia para estudos *in vitro* é difícil, como é o caso de doenças do sistema nervoso. Diversos trabalhos já mostraram ser possível diferenciar as iPSC em neurônios e, dessa forma, estas células se tornaram uma nova ferramenta extremamente interessante no estudo de doenças neurológicas, uma vez que com elas é possível desenvolver modelos neuronais com genomas predispostos a tais doenças (Wernig et al., 2008; Reyes et al., 2008; Dimos et al., 2008).

Linhagens de iPSC de diversas doenças neurológicas já foram geradas, mas poucos são os trabalhos que efetivamente estudaram o fenótipo de neurônios diferenciados a partir destas iPSC.

Considerando-se doenças neurodegenerativas, o uso de neurônios derivados de iPSC de pacientes já mostraram resultados interessantes para atrofia espinhal muscular e Síndrome de Riley-Day, doenças caracterizadas, respectivamente, por uma progressiva degeneração de neurônios motores e de neurônios sensoriais e autonômicos (Ebert et al., 2009; Lee et al., 2009).

A doença para qual existe a maior quantidade de trabalhos utilizando-se desta estratégia para seu estudo é a Doença de Parkinson (DP). Fibroblastos de pacientes com DP foram reprogramados com sucesso para iPSC e estas linhagens, diferenciadas para neurônios dopaminérgicos. No entanto, nenhuma diferença fenotípica foi notada entre estes neurônios e os de controles, o que pode se dever ao fato de a DP ser uma doença de início tardio (Park et al., 2008; Soldner et al., 2009). Dois outros estudos mostraram que neurônios dopaminérgicos e células precursoras neurais derivadas de iPSC de pacientes com DP podem se integrar de maneira eficiente no cérebro de ratos modelo para esta doença, promovendo efeitos funcionais que resultam na melhora dos sintomas nestes animais (Hargus et al., 2010; Wernig et al., 2008). Tais estudos mostram que este

é um bom modelo não só para se explorar os mecanismos moleculares envolvidos na doença, uma vez que é possível analisar estas células em um sistema 3D e sujeito a todas as sinalizações de um nicho específico, mas também para o desenvolvimento de possíveis terapias para os pacientes com DP.

Neurônios motores também já foram gerados a partir de iPSC derivadas de fibroblastos de pacientes portadores de Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA) (Dimos et al., 2008). À semelhança da DP, nenhuma diferença foi encontrada entre os neurônios dos pacientes com ELA e de indivíduos controles, reforçando a questão de se este modelo *in vitro* pode efetivamente recapitular doenças de início tardio.

Com relação a transtornos ligados ao neurodesenvolvimento, linhagens de iPSC já foram geradas de pacientes com as Síndromes do X-Frágil, de Prader-Willi, de Angelman, de Rett e Esquizofrenia (Urbach et al., 2010; Yang et al., 2010; Chamberlain et al., 2010; Marchetto et al., 2010; Chiang et al., 2011; Brennand et al., 2011).

Em um trabalho recente, Chiang e colaboradores (2011) reportaram a derivação de linhagens de iPSC de 2 irmãos afetados por esquizofrenia. Estes dois indivíduos apresentam uma deleção de 4bp no gene *DISC1*, gene já previamente identificado por outros tipos de abordagens como envolvido nesta patologia (Millar et al., 2000; Ross et al., 2006). O método mais utilizado para super expressar os genes necessários à reprogramação celular é a integração destes ao genoma da célula que se quer derivar em iPSC através de um sistema de transdução viral. No trabalho de Chiang e colaboradores, no entanto, os autores utilizaram a integração episomal de vetores. Embora a eficiência de reprogramação alcançada por este sistema seja inferior à alcançada por transdução viral, a vantagem do primeiro é que não há integração genômica dos vetores, algo que pode causar rompimento de genes da célula hospedeira. Este é o principal empecilho para se utilizar as células iPSC obtidas por um sistema de transdução viral para terapia celular e o trabalho destes autores mostra a viabilidade de se produzir linhagens de iPSC livres de integração genômica.

Células de indivíduos com Síndrome do X-frágil também já foram reprogramadas a iPSC. Embora os autores deste trabalho não tenham diferenciado as iPSC em neurônios para estudar o fenótipo destas células, os resultados obtidos pelo grupo com relação à inativação do gene *FMRI* nas iPSC foram extremamente relevantes. Urbach e colaboradores observaram que, ainda que mutado, o gene *FMRI* é expresso em células-tronco embrionárias (*human Embryonic Stem Cells* – hESC), mas é silenciado quando tais células são submetidas a diferenciação. Por outro lado, o estado

de metilação que causa o silenciamento do *FMRI* não é revertido quando fibroblastos de pacientes com a síndrome são reprogramados e o gene permanece inativo nas iPSC. Este é um dado interessante, pois mostra que a reprogramação celular não reverte em absoluto a célula reprogramada para um estado idêntico ao de células embrionárias, mostrando, por exemplo, que alguns eventos epigenéticos não são restabelecidos. Este é um fato que deve ser levado em consideração dependendo da aplicação que se quer fazer das células iPSC.

No entanto, outros dois estudos mostraram que este não é o caso nas Síndromes de Angelman e de Prader-Willi (Chamberlain et al. 2010; Yang et al. 2010). A análise de iPSC derivadas de pacientes com estas síndromes e de hESC mostrou que não há diferença no padrão de metilação do centro de imprinting do locus 15q11-q13 entre estas células. Além disso, demonstrou-se também que o imprinting do *UBE3A*, gene responsável pela Síndrome de Angelman, ocorre durante a diferenciação das células iPSC em linhagens neuronais, da mesma forma como ocorre no cérebro (Chamberlain et al. 2010). Assim, o uso das iPSC para modelagem destas síndromes se mostra um caminho promissor.

Um dos exemplos mais recentes do potencial desta estratégia é o trabalho de Marchetto e colaboradores (2010), o qual demonstrou as implicações de mutações do gene *MeCP2* para o fenótipo neuronal de pacientes com Síndrome de Rett e o possível uso desse modelo para a busca por drogas. Os neurônios obtidos através da diferenciação de iPSC derivadas de fibroblastos de pacientes com Síndrome de Rett apresentaram uma reduzida densidade sináptica, núcleo celular de menor tamanho, alterações na sinalização por Cálcio e alterações no padrão eletrofisiológico quando comparado às células de controles. O uso da droga gentamicina aumentou os níveis de expressão de *MeCP2* e o número de sinapses glutamatérgicas.

Todos estes trabalhos são exemplos da clara contribuição que a modelagem *in vitro* usando iPSC podem trazer para o melhor entendimento de doenças neurológicas, bem como para testes de possíveis terapias.

1.6 OBJETIVOS

Apesar dos resultados significativos encontrados nos estudos conduzidos até o momento, ainda não se pode concluir ao certo quais as alterações genéticas estão contribuindo para os TEA. Inúmeros fatores dificultam estas pesquisas como a caracterização dos pacientes, o tamanho amostral, a provável heterogeneidade genética

da doença e a possibilidade de diversos genes e fatores ambientais estarem interagindo para determinação do fenótipo.

Assim, considerando-se que existe heterogeneidade genética entre os pacientes, os estudos de expressão com *microarrays* é uma estratégia que pode lidar bem com esta questão. Isto porque com esta abordagem é possível avaliar o comportamento de milhares de genes ao mesmo tempo e o que se busca não é apenas verificar o envolvimento de genes específicos, mas também de vias ou processos celulares. Por outro lado, a tentativa de se identificar genes comprometidos por anomalias cromossômicas, em particular de translocações, pode permitir a investigação de um gene específico do ponto de vista funcional, o que também abre caminhos para identificação de vias envolvidas nos TEA. Tal estratégia se vê ainda facilitada pelo advento da reprogramação celular, com a qual tornou-se possível produzir neurônios de indivíduos autistas.

Assim sendo, o nosso objetivo principal é identificar genes e vias relevantes para o desenvolvimento de TEA. Para atingir esta meta, nossas propostas foram:

- a. Mapear os pontos de quebra causados por translocações cromossômicas em pacientes com TEA, na tentativa de se identificar genes que estão rompidos por estas alterações citogenéticas e que sejam relevantes para o fenótipo;
- b. Analisar as implicações funcionais de genes identificados por esta estratégia, utilizando neurônios obtidos a partir de iPSC derivadas de células do próprio paciente;
- c. Verificar se o transcriptoma de células-tronco de polpa de dente tem uma assinatura de expressão gênica nos TEA;
- d. Identificar genes ou vias alteradas em pacientes autistas sem alterações genéticas conhecidas (pacientes idiopáticos) através da análise do perfil de expressão de células-tronco mesenquimais derivadas da polpa de dente de tais pacientes e indivíduos controles.

CAPÍTULO 2 – MATERIAL E MÉTODOS

2.1 PACIENTES

Os pacientes e familiares que fizeram parte deste estudo foram atendidos no Centro de Estudos do Genoma Humano (CEGH), IB/USP. Estes pacientes foram encaminhados ao nosso serviço após serem diagnosticados por profissionais especializados com base nos critérios estabelecidos pela última versão do Manual Diagnóstico e Estatísticos de Transtornos Mentais (DSM-IV) (American Psychiatric Association, 1994). Nossos principais colaboradores são:

Dr. Estevão Vadasz e equipe

Serviço de Psiquiatria da Infância e da Adolescência (SEPIA)

Faculdade de Medicina / Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo

Dr. Wanderley Domingues

Diretor do Centro Pró-Autista

Até Março de 2011, aproximadamente 505 famílias com pacientes com suspeita de TEA foram atendidas em nosso serviço de aconselhamento genético. Dentre estas, cerca de 486 famílias possuem pelo menos uma criança com diagnóstico de autismo de acordo com os critérios do DSM-IV. Em nosso atendimento, foram levantados os dados relativos à gestação da criança, seu desenvolvimento nos primeiros anos de vida e ao histórico familiar, visando identificar outros indivíduos na família portadores de TEA ou outros transtornos psiquiátricos. Durante um período, aplicamos uma entrevista baseada na versão oficial da *Autism Diagnostic Interview – Revised (ADI-R – versão 2002)*, adquirida pelo laboratório em dezembro de 2004 junto à empresa Western Psychological Services (WPS), atual editora responsável pela publicação da entrevista, e traduzida pelo então aluno de doutorado na época, Dr. Guilherme Müller Orabona. A partir de 2009, passamos a utilizar a versão traduzida por um grupo da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) do ASQ (Autism Screening Questionnaire). O ASQ é um questionário baseado apenas em respostas do tipo “sim ou não” e, portanto, de mais fácil utilização quando comparado ao ADI, cujas respostas se baseiam em um sistema de pontuação. A aplicação destes questionários não teve por objetivo diagnosticar os pacientes, mesmo porque a maioria destes já vinham diagnosticados por psiquiatras

especializados, mas visava, sim, o conhecimento do grupo acerca da sintomatologia dos pacientes, bem como o grau de comprometimento destes com relação às áreas de interação social, comunicação e comportamentos repetitivos. Contudo, as versões traduzidas do ADI e do ASQ não foram ainda validadas para o uso em português. Sendo assim, para fins de publicação, o questionário CARS (Childhood Autism Rating Scale) foi ainda aplicado para os pacientes que fizeram parte dos estudos citogenéticos e de expressão (Anexo 1).

Para todos os pacientes do sexo masculino, o diagnóstico diferencial de síndrome do X-frágil foi feito por teste molecular, realizado pela Mestra Vanessa Van Optiz do Centro de Estudos do Genoma Humano – IB/USP. Aqueles pacientes que apresentaram alteração no teste molecular foram submetidos ao teste da Síndrome do X-Frágil por southern blot, realizado pela equipe da Dra. Angêla Maria Viana Morganti. Nenhum dos pacientes selecionados para os estudos de expressão e citogenéticos apresentaram mutação no gene *FMR1*.

Alguns dos pacientes com anomalias cromossômicas já haviam realizado o exame de cariótipo antes de passar pelo nosso serviço. Nestes e nos casos em que o paciente apresentava alguma outra alteração clínica, como dismorfismos faciais ou malformações congênitas, um novo exame de cariótipo foi realizado por nossa equipe técnica.

Em 2008, realizei um levantamento de nossa amostra de pacientes a fim de caracterizá-la com relação à porcentagem de casos familiares e casos de Síndrome do X-Frágil. Este trabalho, intitulado “Doença Psiquiátricas e pré-mutação no gene *FMR1* em famílias com transtorno do espectro autista”, foi apresentado na forma de pôster na conferência “VII São Paulo Research Conferences - Cérebro e Pensamento” e encontra-se no anexo 2. Uma atualização desta caracterização da amostra está sendo feita pela aluna de mestrado Danielle Moreira e o trabalho será submetido em breve para publicação.

2.2 ASPECTOS ÉTICOS

Parte deste projeto de pesquisa é uma extensão do projeto “Estudo de associação entre genes de receptores de serotonina e o autismo”, aprovado no Comitê de Ética do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (protocolo nº028/2004).

O projeto “Novas abordagens no estudo das causas genéticas dos transtornos do espectro autista”, que propõe o uso de células-tronco dos pacientes autistas para a pesquisa, também foi submetido e aprovado pelo mesmo comitê (protocolo n° 049/2006).

2.3 EXTRAÇÃO DE DNA

A extração do DNA de amostras de sangue periférico dos pacientes e seus familiares é realizada pelo robô de extração de DNA Autopure Is (Gentra Systems), adquirido pelo Centro de Estudos do Genoma Humano e utilizado na rotina do laboratório ou manualmente, utilizando o protocolo baseado em Miller et al. (1988).

2.4 EXTRAÇÃO DE RNA

O RNA total dos linfócitos, DPSC e iPSC foram obtidos de acordo com a técnica de extração com o uso de TRIzolTM (Invitrogen), método já padronizado e utilizado em nosso laboratório, purificado com o uso do RNeasy kit (Qiagen) e tratado com Turbo DNase-free (Ambion). Em alguns casos, o RNA total das DPSC foram extraídos com o kit NucleoSpin RNAII (Macherey-Nagel), o qual já purifica o RNA de contaminantes químicos usados no processo de extração e inclui um passo de tratamento da amostra com DNase, dispensando a utilização de outros kits para tais finalidades. A qualidade dos RNAs foi analisada em gel de agarose 0,7% e a quantificação foi feita pelo espectrofotômetro NanoDrop ND 1000 (Peqlab biotechnologie).

2.5 ESTABELECIMENTO DAS CULTURAS DE CÉLULAS-TRONCO DE POLPAS DENTÁRIAS

Todas as linhagens de células-tronco foram obtidas a partir da polpa de dentes decíduos dos pacientes e controles selecionados como relatado a seguir.

A polpa foi separada da coroa do dente e digerida em uma solução de 0,25% de tripsina (Invitrogen) por 30min a 37°C. As polpas foram então cultivadas em placas de 6-well com meio DMEM:F12 (Invitrogen) suplementado com 15% de Soro fetal bovino (Hyclone), 100M/ml estreptomicina (Biofluids) e incubadas a 37°C em 5% CO₂. O meio foi trocado uma vez por semana até que houvesse liberação das células-tronco a partir das polpas. As células foram cultivadas até a terceira passagem e então estocadas para os experimentos em meio contendo 40% de soro fetal bovino e 10% de DMSO.

2.6 CARACTERIZAÇÃO DOS PONTOS DE QUEBRA PELA TÉCNICA DE FISH (FLUORESCENT IN SITU HYBRIDIZATION)

Até o momento em que os casos para este estudo foram selecionados, cerca de 1,5% dos pacientes atendidos em nosso serviço apresentaram algum tipo de alteração cromossômica identificada por cariótipo. Dentre estes casos, dois pacientes são portadores de translocações cromossômicas balanceadas *de novo*, ou seja, que não estão presentes em nenhum dos progenitores.

Os dois pacientes já vieram ao nosso serviço com estas alterações identificadas por outros laboratórios e estas foram confirmadas através de um novo exame de cariótipo realizado por nosso grupo. As alterações identificadas foram:

Paciente F2749: translocação balanceada (3;11) (p21;q22)

Paciente F2297: translocação balanceada (2;X) (q11;q24)

Embora casos de deleções cromossômicas também terem sido identificadas em nossa amostra, julgamos os casos supracitados mais interessantes para investigação, pois translocações podem causar o rompimento de algum gene ou a separação de um gene de sua região regulatória. Casos de duplicações ou deleções detectadas por cariótipo representam ganhos ou perdas de regiões cromossômicas grandes as quais contêm muitos genes, sendo, portanto, mais difícil especular quais genes estariam de fato envolvidos com o fenótipo apresentado pelo indivíduo portador da alteração cromossômica.

As metáfases utilizadas tanto para a realização do cariótipo quanto para o mapeamento do ponto de quebra através da técnica de FISH foram obtidas após o cultivo de células obtidas a partir do sangue tratadas com colchicina, seguindo-se protocolos já bem estabelecidos.

O mapeamento do ponto de quebra foi feito utilizando-se sondas do tipo BAC da biblioteca RPCI-11 (Roswell Park Cancer Institute). As BACs utilizadas foram selecionadas através do banco de dados do site da UC Santa Cruz (<http://genome.ucsc.edu/>, assembly Mar. 2006, NCBI36/hg18) e cultivadas em meio apropriado, contendo o antibiótico cloranfenicol para seleção apenas das bactérias contendo o BAC. A extração dos plasmídeos foi realizada com o kit NucleoBond BAC 100 (Macherey-Nagel). As sondas foram marcadas através da reação de Nick translation, que incorpora uracilas marcadas com os fluoróforos FITC ou Cy3. As

sondas foram precipitadas na presença de Human Cot DNA e Sonicated Salmon DNA, o que evita que as sondas se liguem a regiões genômicas repetitivas e inespecíficas. A hibridação das sondas nas lâminas contendo as metáfases fixadas é feita seguindo-se protocolos padrão. Após lavagem das lâminas e marcação dos cromossomos com DAPI, estas foram expostas a um microscópio de luz fluorescente e as imagens foram tratadas utilizando-se o software OpenLab (versão 5.5). Este estudo foi realizado no laboratório do Dr. Matthew State, da Yale University School of Medicine, com a colaboração da técnica Nicole Davis.

As análises *in silico* foram feitas utilizando-se os bancos de dados do *UCSC genome browser* (<http://genome.ucsc.edu/>) e do *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Utilizando-se estes dois bancos de dados, todos os genes localizados na região compreendida entre 1Mb distal e 1Mb proximal ao ponto de quebra foram investigados com relação a: função; expressão no cérebro; interações com outros genes; doenças associadas; modelos animais; e referências no PubMed relacionando o gene a funções neurológicas ou doenças psiquiátricas.

2.7 ANÁLISE DE VARIAÇÕES DO NÚMERO DE CÓPIAS NOS PACIENTES PORTADORES DE TRANSLOCAÇÕES CROMOSSÔMICAS

As amostras de DNA dos pacientes portadores de translocações cromossômicas também foram hibridadas em lâminas de array de SNPs do sistema Illumina (HumanHap300 Genotyping BeadChip), de acordo com o protocolo do fabricante, para detecção de possíveis micro-deleções ou micro-duplicações, as chamadas CNVs (*Copy Number Variations*). Os dados dos arrays foram analisados através dos softwares PennCNV (Wang et al., 2007) e QuantiSNP (Colella & Yau et al., 2007). Os resultados obtidos foram comparados a um banco de dados que contém informações sobre variações de número de cópias no genoma observadas em indivíduos controles, o *Database of Genomic Variants* (<http://projects.tcag.ca/variation/>). Esta comparação visa identificar quais alterações vistas nos pacientes são raras ou comuns. Estes experimentos foram realizados na *Yale Keck Microarray Facility* e as análises foram executadas pelos pós-doutorandos do laboratório do Dr. Matthew State, Christopher Mason e Stephan Sanders.

2.8 TRIAGEM DE MUTAÇÃO E SEQÜENCIAMENTO DO GENE *TRPC6*

Uma amostra de 400 pacientes do AGRE (Autism Genetic Resource Exchange) e 300 pacientes atendidos pelo nosso grupo foi submetida a triagem de mutação no gene *TRPC6*, gene identificado como rompido no paciente F2749. Catorze pares de primers foram desenhados para amplificar os 13 éxons deste gene. Uma triagem inicial foi feita por DHPLC (Denaturing high-performance liquid chromatography) e os éxons dos indivíduos que apresentaram qualquer alteração com relação a seqüência selvagem por esta técnica foram seqüenciados. Este trabalho foi realizado no laboratório do Dr. Matthew State pela técnica Kristin Rose.

Além disso, o paciente que apresenta o rompimento do *TRPC6* e seus pais tiveram os éxons deste gene seqüenciados por completo. Uma amostra de DNA e de cDNA do paciente e de um controle foram seqüenciadas para a genotipagem de um polimorfismo existente no éxon 6 e outro no éxon 13. Os amplicons foram obtidos por PCR convencional e o seqüenciamento das amostras foi feito pela empresa ETON Bioscience Inc (La Jolla, CA). Os primers utilizados nestes experimentos estão descritos no capítulo 2.

2.9 QUANTIFICAÇÃO PROTÉICA POR WESTERN-BLOT

As células foram lisadas com o tampão Phosphosafe (Calbiochem) o qual já é suplementado com inibidores de fosfatases. As células foram então centrifugadas a 10.000g por 10 minutos a 4°C. A quantificação das proteínas CREB, P-CREB e B-actina foram realizadas através da técnica de western-blot seguindo-se protocolos já bem estabelecidos. Os seguintes anticorpos primários foram utilizados neste trabalho:

- Rabbit anti-CREB (Cell Signalling, 1:500)
- Rabbit anti-P-CREB (Cell Signalling, 1:500)
- Mouse anti-B-actin (Ambion, 1:10.000)

Os anticorpos conjugados a peroxidase goat anti-Rabbit e goat anti-Mouse (Promega, 1:5.000) foram usados como anticorpos secundários. O kit ECL Plus (GE HealthCare) foi usado para a detecção do sinal e a quantificação foi realizada com auxílio do software ImageJ.

2.10 TESTES COMPORTAMENTAIS EM CAMUNDONGOS MUTADOS PARA O GENE *TRPC6*

Os camundongos deficientes para o gene *TRPC6* foram doados pelo Dr. Alexander Dietrich, da Universidade de Munique, Alemanha. O teste “three-chambers” (ou em português, três câmaras) foi utilizado para a avaliação do comportamento social de camundongos selvagens, heterozigotos e knockouts para o gene *TRPC6*. Este teste consiste em uma caixa de acrílico dividida em três compartimentos comunicáveis entre si. Na fase inicial do teste, o camundongo é colocado na caixa e passa por um período de 10 minutos de ambientação no escuro. Em seguida, o animal foi observado por mais 10 minutos e foi medido o tempo despedido pelo animal em comportamentos de “grooming” (comportamentos que envolvem a limpeza dos pêlos e fucinho, por exemplo), para se avaliar comportamentos repetitivos. Após 5 minutos de ambientação a uma condição de luz, uma pequena gaiola vazia e outra contendo um animal novo para o indivíduo teste são colocadas cada uma em uma das câmaras da caixa de acrílico. O tempo despedido pelo animal em cada uma das câmaras e o tempo em que este interagiu com o animal desconhecido foi contabilizado. Foram testados cerca de 15 camundongos de cada um dos genótipos e os dados foram analisados utilizando-se o teste ANOVA não paramétrico de Kruskal-Wallis.

2.11 GERAÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO PLURIPOTENTE INDUZIDAS (iPSC) A PARTIR DE CÉLULAS-TRONCO DE POLPA DE DENTE

As células iPSC do paciente F2749 e de um controle foram obtidas a partir das DPSC destes indivíduos de acordo com o protocolo descrito em Takahashi et al., 2007. Brevemente, a expressão de SOX2, c-MYC, OCT4 e KLF4 foi induzida nas DPSC através da transdução destas células com vírus contendo tais genes. A super expressão destes genes leva a uma série de alterações epigenéticas ainda não totalmente compreendidas que, por sua vez, levam células em um estágio de diferenciação mais avançado reassumirem um estado pluripotente. Após a transdução, as DPSC são cultivadas em conjunto com fibroblastos embrionários murinos, os quais se acredita que liberam fatores importantes para o processo de reprogramação e manutenção do estado de pluripotência. Após cerca de duas semanas, as colônias de células iPSC são identificadas por sua morfologia e transferidas para novas placas de cultivo que são cobertas com o material Matrigel (BD Biosciences) e mantidas com o meio de cultivo mTeSR (Stem Cell Technologies). O protocolo detalhado está descrito no anexo 3.

Este trabalho foi desenvolvido no laboratório do Dr. Alysson Muotri, na University of California at San Diego.

2.12 ANÁLISE DA FORMAÇÃO DE TERATOMAS

O método que comprova de maneira irrefutável o sucesso da reprogramação celular é a obtenção de teratomas em camundongos imunossuprimido após a injeção das iPSC nestes animais. Isto porque o teratoma é um tipo de carcinoma formado por tipos celulares oriundos dos três diferentes folhetos embrionários. Aproximadamente 5×10^6 células foram coletadas após tratamento das mesmas com 0,5mg/ml de dispase, decantadas em um tubo cônico e ressuspensas em 300ul de matrigel (BD Bioscience). As células foram então injetadas subcutaneamente em camundongos imunossuprimidos. Aproximadamente após 5 semanas, os tumores formados foram dissecados e fixados em 4% paraformaldeído. Os tumores foram embebidos em parafina e cortes seriados foram corados com hematoxilina-eosina para análise histológica.

2.13 DIFERENCIAÇÕES DAS CÉLULAS IPS PARA CÉLULAS PROGENITORAS NEURAIS (NPCs) E NEURÔNIOS

As células iPSC foram diferenciadas para NPCs e neurônios de acordo com o seguinte protocolo. Quatro dias após o plaqueamento das iPSC, o meio mTeSR (Stem Cell Technologies) foi substituído de pelo meio 1xNB. Este meio consiste de uma mistura na razão 1:1 de Neurobasal-A Media (Invitrogen) e DMEM/F12 (Cellgro), acrescido dos suplementos N2 e B27 (Invitrogen) a uma concentração final de 1x. Além disso, são adicionados os fatores FGF (R&D) e EGF (Peprotech) a uma concentração de 20ng/ml, e ITS (Roche) a uma concentração de 1x. As colônias de iPSC foram mantidas neste meio por dois dias e então removidas com o auxílio da enzima dispase (0,5mg/ml; Gibco). As colônias foram então transferidas para placas de baixa aderência e mantidas no mesmo meio sob agitação a 100rpm por 6 dias. Um dia após a transferência das colônias já é possível observar a formação dos corpos embrioides (Embrioid Bodies - EBs). No sétimo dia, parte dos EBs é utilizada para a obtenção de NPCs. Os EBs são dissociados com o auxílio da enzima acutase (Millipore) e as células assim obtidas são plaqueadas em placas cobertas com matrigel. As células são então mantidas com meio 0.5x NB, o qual consiste da mesma combinação de meios, suplementos e fatores, exceto pela mudança da concentração dos suplementos N2 e B27, que passa a ser de 0.5x. Um

dia após o plaqueamento é possível notar que as células estão organizadas em rosetas, estruturas indicativas da presença de células progenitoras neurais em culturas derivadas de células-tronco embrionárias. Nestas estruturas, as células se encontram organizadas radialmente e expressam muitas das proteínas expressas em células neuroepiteliais presentes no tubo neural. Após um período de 2 ou 3 dias, as rosetas são coletadas manualmente e transferidas para uma nova placa de matrigel. Novamente após 3 dias, as células são removidas, agora com acutase, e replaquedadas em placas cobertas com 10ug/ml de poli-ornitina (Sigma) e 5ug/ml de laminina (Invitrogen), formando uma população homogênea de NPCs.

Os demais EBs são mantidos na placa de baixa aderência por mais três semanas, durante as quais são tratados com meio para indução de neurogênese. Durante a primeira semana, os EBs são tratados com meio 0.5x NB acrescido de 1uM de ácido retinóico e 200ng/ml de ácido ascórbico. Na segunda semana, além de ácido retinóico e ácido ascórbico, é acrescentado ao meio 20ng/ml de GDNF. Ao final da terceira semana, é possível observar que os EBs encontram-se bem maiores, com bordas bem definidas e uma região radial mais translúcida do que o centro. Os EBs são então tratados com as enzimas papaína e DNase (Worthington) a 37oC por 1h, triturando-se os EBs eventualmente. As células são filtradas através de um filtro de 40um para remoção de quaisquer partes não dissociadas dos EBs e centrifugadas para remoção das enzimas. As células são então ressuspensas no meio 0.5x NB acrescido dos seguintes fatores: 1uM de ácido retinóico (Sigma), 200ng/ml de ácido ascórbico (Sigma), 20ng/ml de GDNF (Preprotech), 0.5% de FBS (Omega Scientific) e 0.5ug/ml de laminina (Invitrogen). A concentração das células é calculada e as mesmas são plaqueadas na seguinte densidade: 10^5 células por well em slides de 4 wells para microscopia; 10^6 células em placas de 35mm de diâmetro; e 10^7 células em placas de 10cm de diâmetro. No dia seguinte ao plaqueamento, é possível notar uma população heterogênea de células, com a presença de neurônios e glia. No primeiro dia, os neurônios apresentam processos ainda curtos, que se tornam mais longos ao redor do terceiro ou quarto dia. Após cerca de três semanas as células foram fixadas para imunocitoquímica.

2.14 IMUNOCITOQUÍMICA

As células foram fixadas para imunocitoquímica com paraformaldeído 4%, lavadas por três vezes em PBS e em seguida permeabilizadas com 0.5% Triton X-100. As lâminas foram então incubadas por uma hora em solução bloqueadora (PBS

contendo 0.5% Triton X-100 e 5% de soro fetal de burro) e em seguida, incubados com os anticorpos primários por ~16h a 4°C. As células foram novamente lavadas com PBS e incubadas com solução bloqueadora por 30 minutos antes de serem incubadas com os anticorpos secundários por uma hora a temperatura ambiente. Anticorpos primários utilizados: anti-Nestin (Santa Cruz); anti-Musashi (Santa Cruz); anti-MAP2 (Millipore); anti-VGluT (Synaptic Systems); anti-Sox2; anti-Nanog; anti-Oct4 (Santa Cruz); anti-Lin28. Anticorpos secundários utilizados: FITC anti-rabbit e Cy3 anti-mouse (Jackson ImmunoResearch). Os slides foram visualizados em microscopia de fluorescência e as imagens adquiridas com a ajuda do software AxioCam (Zeiss).

2.15 ANÁLISE DO PERFIL DE CICLO CELULAR DAS NPCs

As NPCs do paciente F2749 e do controle foram plaqueadas em mesma densidade em placas de 10cm de diâmetro e coletadas dois dias depois. As células foram fixadas em etanol 70% a 4°C por 24h e então coradas com 200 µl de PI (iodeto de propídeo – 20µg/ml PI; 200µg/ml Rnase A e 0,1% Triton X-100) para análise em citometria de fluxo. O reagente PI se liga ao DNA e emite uma fluorescência que pode ser lida pelo citômetro de fluxo. Dessa forma, pela intensidade de fluorescência pode-se identificar a quantidade de DNA presente em cada célula e, assim, se delinear o perfil do ciclo celular e taxas de proliferação. Os dados obtidos pelo citômetro de fluxo (Becton Dickinson LSRI) foram analisados pelo software FLOWJO-Flow Cytometry Analysis .

2.16 ESTUDO DO INFLUXO DE CÁLCIO VIA TRPC6

Para a análise das mudanças de níveis intracelulares de Ca^{+2} através do canal TRPC, as células foram incubadas por 45 minutos a 37°C com 2,5µM de Fluo-4AM (Invitrogen) e então lavadas com o tampão HBSS. As drogas OAG (1-oleoil-2-acetil-sn-glicerol; Sigma) ou hiperforina (cedida gentilmente por Dr Willmar Schwabe GmbH & Co, Karlsruhe, Germany) foram usadas em combinação com FFA (ácido flufenâmico; Sigma) para ativação do canal TRPC6. A droga hiperforina ativa especificamente o canal TRPC6, enquanto OAG ativa os canais TRPC3, 6 e 7 (Hofmann et al., 1999; Okada et al., 1999; Leuner et al., 2007). O uso de FFA impede o influxo via canais TRPC3 e 7, tornando a combinação OAG+FFA específica para o canal TRPC6 e potencializa o efeito da hiperforina (Inoue et al., 2001). As imagens foram feitas com o auxílio da câmera Olympus BX70 acoplada ao sistema de microscopia confocal Biorad MRC 1024 a intervalos de 6s durante 30 minutos. As drogas foram aplicadas através de

um sistema de perfusão no terceiro minuto. Para cada experimento (OAG ou hiperforina) foi analisada uma triplicata de cada indivíduo. As análises da intensidade do sinal de Cálcio foram feitas pelo software ImageJ, com o auxílio dos plug-ins MultiMeasure e MeasureStacks.

2.17 ANÁLISE DAS SINAPSES GLUTAMATÉRGICAS DOS NEURÔNIOS OBTIDOS A PARTIR DE CÉLULAS IPS

Os neurônios do paciente F2749 e controle foram obtidos através de um processo de diferenciação das células iPSC já descritos na seção 2.13. Duas semanas após o plaqueamento, os neurônios foram submetidos a imunocitoquímica, conforme descrito na seção 2.14. Os slides foram visualizados em microscopia de fluorescência e as imagens adquiridas com a ajuda do software AxioCam (Zeiss). Foram analisados aproximadamente 30 neurônios de cada preparação com o auxílio do software ImageJ. Para as análises estatísticas utilizamos o software GraphPad Prism v.4.

2.18 ESTUDO DE EXPRESSÃO GÊNICA GLOBAL POR MICROARRAYS

Análises de expressão gênica global foram realizadas utilizando-se o chip Human Gene 1.0ST array da Affymetrix. Foram 3 as análises dessa natureza realizadas neste trabalho: comparação dos perfis de expressão de hESC, iPSC e DPSC, a fim de se avaliar o sucesso da reprogramação celular das DPSC; comparação entre os perfis de expressão das DPSC do paciente F2749 e de controles, a fim de se identificar genes que poderiam estar diferencialmente expressos devido a alteração no gene *TRPC6* que este paciente apresenta; e comparação dos perfis de expressão das DPSC de 7 pacientes autistas idiopáticos e de controles, a fim de se identificar genes diferencialmente expressos entre estes dois grupos. Todos os experimentos foram conduzidos seguindo-se o protocolo recomendado pelo fabricante, descrito sumariamente a seguir.

A partir de 100 ng do RNA total, é sintetizada a primeira fita de cDNA seguida de reação de síntese da segunda fita. Em seguida, a amostra passa por uma transcrição *in vitro* por 16 horas. Do cRNA obtido e purificado, sintetiza-se o cDNA de fita única com dUTP, que é purificado, fragmentado e marcado com biotina. Este cDNA é hibridado por 17 horas à lâmina Human Gene 1.0 ST com o auxílio de um forno de hibridação a 45 °C a 60 rpm. O processo de marcação por Streptavidina e de lavagem da lâmina ocorre na estação fluídica (GeneChip® Fluidics Station 450) comandada por um

computador. Por fim, as lâminas são escanadas pelo GeneChip® Scanner 3000 7G System e um relatório de controle de qualidade é gerado pelo Affymetrix® Expression Console™ Software. As lâminas utilizadas em nossos experimentos estavam todas dentro dos parâmetros considerados bons por este controle de qualidade.

As análises dos resultados foram feitas com a ajuda da aluna de doutorado Daniele Yumi Sunaga. Os dados foram normalizados com o método RMA (Robust Multi-array Average) (Irizarry et al., 2003), disponível no pacote Bioconductor do programa R. Os genes diferencialmente expressos (*Differentially Expressed Genes* - DEGs) foram selecionados com os métodos SAM (*Significance Analysis of Microarrays*, Tusher, et al., 2001) e RankProd (Hong et al., 2006), disponíveis no programa MeV. Os parâmetros de análise adotados em ambos os métodos foram:

- método SAM: análise de duas classes não pareada, p-value < 0.05 ajustado por FDR (*False Discovery Rate*) e 3.000 permutações
- método RankProd: análise de duas classes não-pareadas, p-value < 0.0005 e 4.000 permutações.

Na análise entre as linhagens de hESC, iPSC e DPSC bem como para a análise entre o paciente F2749 e controles, utilizamos o método estatístico SAM. Já para a seleção dos DEGs entre pacientes idiopáticos e controles, optamos em utilizar o método estatístico RankProd. O RankProd é um método não-paramétrico baseado em ranking. Ele apresenta a vantagem de lidar bem com poucas amostras e identificar mudanças de expressão relevantes biologicamente (Hong et al., 2006). Genes selecionados pelo RankProd não precisam necessariamente apresentar expressão homogênea em todas as amostras. Esta característica faz deste método uma boa alternativa para o estudo de doenças complexas, onde é esperada a expressão alterada de um gene candidato somente em um subconjunto de indivíduos afetados devido à heterogeneidade genética multi-locus e à natureza estocástica da expressão gênica em sistemas complexos (Raj et al., 2010).

A análise funcional dos DEGs selecionados, funções biológicas associadas, vias canônicas e redes biológicas foram analisadas através das ferramentas IPA (Ingenuity Pathway Analysis - www.ingenuity.com) e DAVID v6.7 (Database for Analysis, Visualization and Integrated Discovery - <http://david.abcc.ncifcrf.gov/home.jsp>). Além disso, verificamos a predição de regulação por CREB dos DEGs da análise do paciente

F2749 através do banco CREB target genes database (<http://natural.salk.edu/CREB/>), o qual está descrito em Zhang et al., 2005.

2.19 TRATAMENTO DAS DPSC COM HIPERFORINA

As DPSC de um indivíduo controle foram tratadas com 10uM de hiperforina e 85uM de FFA pelos períodos de 15', 30', 1h, 3h, 6h, 24h e 48h. O RNA de cada uma das amostras foi extraído, transformado em cDNA e a expressão dos transcritos CLDN11, EPHA4, SEMA3A, INA, MAP2, CDH6 e NPTX1 foram avaliadas por PCR quantitativo em tempo real.

2.20 ANÁLISES DE EXPRESSÃO POR PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL

A técnica de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR) foi utilizada nas seguintes situações:

- a. análise de expressão dos genes *UBE2A*, *CDH18*, *GLUD2* e *GABRB2* na paciente F2297,
- b. análise de expressão dos éxons 4, 6, 12 e 13 do gene *TRPC6*,
- c. verificar se os genes *EPHA4*, *CLDN11*, *SEMA3A*, *INA*, *MAP2*, *CDH6* e *NPTX1* são regulados pela via induzida pela ativação do *TRPC6*,
- d. validação de genes diferencialmente expressos identificados nos estudos de microarray de expressão.

Todos os primers utilizados nestas análises foram desenhados usando-se o programa PrimerExpress v. 2.0 (Applied Biosystems) e estão descritos na tabela 1, ao final deste capítulo. Importante ressaltar que todos os primers foram desenhados para amplificar regiões de junções de éxons, para evitar a amplificação de possíveis contaminações da amostra por DNA genômico.

A transcrição reversa das amostras foi feita a partir de 2ug de RNA obtidos a partir de linfócitos ou DPSC, dependendo do caso, utilizando-se o protocolo da enzima Superscript II com random primers (Invitrogen). As reações de PCR quantitativo em tempo real foram feitas no sistema de detecção Applied Biosystems 7500 (Applied Biosystems) de acordo com o protocolo do fabricante do SYBER-Green master mix (idem).

Diferentes concentrações dos primers (1uM, 2uM, 4uM e 6uM) foram testadas através de uma análise de curva de dissociação (curva de Melting), realizada após uma reação de PCR em tempo real, para verificar a formação de dímeros de primer ou a amplificação de produtos inespecíficos, o que interfere na quantificação real do transcrito alvo. Os resultados das amplificações e das curvas de dissociação foram analisados com o auxílio do software 7500 System SDS v. 1.2 (Applied Biosystems) e através destas análises, a concentração ideal de uso de cada um dos pares de primers foi escolhida (Tabela 1).

Os transcritos alvo selecionados foram quantificados em amostras de RNA de quantidades iniciais conhecidas (100ng, 10ng, 1ng e 0,1ng). Este procedimento é necessário para avaliar se existe uma amplificação proporcional à quantidade inicial do transcrito na amostra. Os gráficos de dispersão *log da quantidade X Ct das amostras* geraram curvas padrão lineares para todos os transcritos (valores de R^2 entre 0,98 e 1), mostrando que os primers utilizados amplificam os transcritos alvo de maneira proporcional, independente da quantidade inicial dos mesmos na amostra. O coeficiente da reta é utilizado para calcular o valor de eficiência do primer, segundo a fórmula: $E = -1/\text{coeficiente da reta}$. Um valor de $E=2$ representa uma amplificação de 100% da quantidade inicial de cDNA a cada ciclo do PCR. Considera-se admissível uma variação de $\pm 10\%$ deste valor, ou seja, para resultados confiáveis, os primers devem ter um valor de eficiência entre 1,8 e 2,2. Todos os primers utilizados nestas análises possuíam eficiências dentro destes parâmetros e estas estão descritas na tabela 1.

Todas as amostras foram feitas em triplicata, utilizando-se a média entre elas para as análises estatísticas. As quantificações dos transcritos alvos não podem ser utilizadas para as análises estatísticas no seu valor absoluto, devendo ser este valor normalizado com relação à quantificação de um gene envolvido em funções básicas necessárias para a manutenção da célula, os chamados “*housekeeping genes*”. Sendo assim, todas as amostras foram quantificadas também para os genes *GAPDH*, *HMBS*, *HPRT1* e *SDHA*. O programa geNorm v. 3.4 (www.medgen.ugent.be/genorm/), utilizando os valores de quantificação destes quatro genes, foi utilizado para determinar os genes referência mais estáveis e calcular um fator de normalização para cada uma das amostras. Os princípios das análises e cálculos feitos pelo programa geNorm estão descritos em Vandesompele et al., 2002.

Os valores de quantificação normalizados de cada amostra foram obtidos da seguinte maneira:

- **Cálculo do ΔCt :** Este valor é obtido subtraindo-se o valor de Ct obtido para a amostra do valor do Ct de uma amostra referência.
- **Cálculo do $\Delta\Delta Ct$:** É o valor resultante da eficiência do primer que amplifica o transcrito em questão elevado ao valor do ΔCt da amostra
- **Valor normalizado final:** Obtido através da divisão do valor de $\Delta\Delta Ct$ pelo valor do fator de normalização gerado pelo programa geNorm

Para verificar a existência de uma diferença significativa nos níveis de expressão dos genes alvo entre pacientes e controles foi aplicado o teste t bilateral não pareado com correção de Welch, utilizando-se o software GraphPad Prism (versão 4.03).

Tabela 1. Sequência dos primers utilizados nos experimentos de qRT-PCR com suas respectivas concentrações ideais de uso (concentração final na reação) e eficiências.

Gene	Primer F	Primer R	Molaridade	Eficiência
GAPDH	TGCACCACCAACTGCTTAGC	GGCATGGACTGTGGTCATG	200nM	1,87
HPRT1	TGACACTGGCAAAACAATGC	GTCCTTTTCACCCAGCAAGC	400nM	1,96
HMBS	GGCAATGCGGCTGCAA	GGTAAGGCACGCGAATCAC	200nM	1,85
SDHA	TGGGAAC AAGAGGGCATCTG	CCACCAC TGCATCAAAATTCATG	600nM	1,97
TRPC6(4)	TGGTCCACGCATTATCTTCCC	TTACGACAGCAGACAATGGCG	200nM	2,07
TRPC6(6)	GCATGCTTCCAAAGCCCAGAG	CCACTTTATCCTGGGCCAAATTG	400nM	2,17
TRPC6(12)	TGTACTGCAGGCCCAAGATAGA	GGAGTTCATAGCGGAGACTTG	400nM	2,15
TRPC6(13)	CAAGTCTCCGCTATGAAC TCC	CCTCTTGATTGGTTCCATGGA	100nM	1,96
CDH6	AGCTGCAGTTTCAGCCGCGA	AGGATATCTCTGCTCGCCTTCCTG	100nM	1,87
CLDN11	CTGGGTCTGCCGGCCATTTT	GCGCAGAGCCAGCAGAAATGA	100nM	2,01
SEMA3A	CACTGCAAAGAGACGCACAAG	GCTGTGGCCATGGTGATTATC	400nM	2,02
EPHA4	CAAGATACAGTGTGGCACTGG	GCTTCGCTCATCTGTGATCCTTC	400nM	1,95
NPTX1	ACGAGCTGGTCCCTCATTGAGT	TGCCACTTGCCATCATTTGATG	100nM	1,91
MAP2	CCTTTGAGAAACACGACACAAC	GCCTTTGCTTCATCTTTCCGT	200nM	2,00
INA	GGAAACACCAAGAGTGAGATG	GCCTTCCAGCAGTTTCC TGTA	100nM	1,95
PCDH10	GGACTGCTGACTAATACGCGA	GCAAAATCATGCTGCTTCAGGT	100nM	1,96
DSP	GTGGATCAATGACTGCGAGGA	GACTCATGCGTATGGAGAAGG	400nM	2,04
UBE2A	CCAGGCTGCTCAGCTGTAC	CGGGGTCAACAATCACCCGC	200nM	2,02
CDH18	TGCGGACCTGCCATGCAGAAG	GCTGCGCCTCAGGGGTGATAAA	400nM	-
GABRB2	TGCATGATGGACCTAAGGAG	CCACGCCAGTAAACTCAATG	400nM	-
GLUD2	GGGAGTCTGAGAAAGCGCAC	AGGTAGCGGTACATCGCGG	100nM	-

CAPÍTULO 3

***A de novo* balanced translocation (2:X)(q11.2;q22) and maternal isodisomy on chromosome 5 associated with autism disorder**

Karina Griesi-Oliveira¹, Danielle de Paula Moreira¹, Nicole Davis², Stephan Sanders², Christopher Mason², Guilherme Müller Orabona¹, Estevão Vadasz³, Débora Bertola⁴, Matthew W. State², Maria Rita Passos-Bueno¹

1 Centro de Estudos do Genoma Humano, Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

2 Child Study Center, Yale University School of Medicine, New Haven, Connecticut, USA

3 Instituto de Psiquiatria do Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

4 Instituto da Criança do Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

Corresponding author: passos@ib.usp.br

Keywords: autism spectrum disorders, cytogenetic abnormalities, balanced translocation, isodisomy chromosome 5, FISH

Abstract

The investigation of chromosomal alterations and rare *de novo* copy number variations, estimated to be present in around 10% of autism spectrum disorder (ASD) cases, has proven to be a rewarding strategy for the identification of candidate genes for these disorders. We used fluorescent *in situ* hybridization (FISH) and SNP-based arrays to characterize a *de novo* balanced chromosomal translocation t(2;X)(q11;q24) identified in a female ASD patient. We did not find any functionally known relevant gene disrupted by the breakpoints but, surprisingly, SNP-array data showed that the patient also presents an isodisomy on chromosome 5, which was maternally inherited. Functionally relevant genes located near the breakpoint on chromosome X (*UBE2A* and *GLUD2*) and genes that are possible targets of imprinting effects on chromosome 5 (*GABRB2* and *CDH18*) are potential candidates for ASD in this patient.

Resumo

O estudo de alterações cromossômicas e de variantes de número de cópias raras, presentes em aproximadamente 10% dos casos de transtornos do espectro autista (TEA), tem se mostrado uma abordagem muito promissora para a identificação de genes ligados a estes transtornos. Neste trabalho, nós utilizamos a técnica de *Fluorescent In Situ Hybridization* (FISH) e microarrays de SNP a fim de caracterizar uma translocação cromossômica balanceada *de novo* [t(2;X)(q11;q24)] presente em uma paciente com TEA. Não encontramos nenhum gene caracterizado e funcionalmente relevante rompido pelos pontos de quebra desta translocação, porém o estudo com microarrays de SNP revelou que a paciente também é portadora de uma isodissomia materna do cromossomo 5. Genes funcionalmente relevantes localizados próximos aos pontos de quebra do cromossomo X (UBE2A e GLUD2) e genes que são possivelmente alvos de imprinting no cromossomo 5 (GABRB2 e CDH18) foram identificados como potenciais candidatos para o TEA nesta paciente.

Introduction

Autism Spectrum Disorders (ASDs) are a group of neurodevelopmental diseases with onset in early childhood and an estimated prevalence of 0.1% (Fombonne, 2009). It is widely accepted that ASD has a strong genetic component, with a high heritability index (El-Fishawy & State, 2010). However, their genetic architecture is very heterogeneous, and both multifactorial and Mendelian models seem to play a role in ASD etiology. Despite the enormous effort to identify the genetic factors and mechanisms involved in ASD, still very few genes have been definitely associated with this complex disorder.

It is estimated that chromosomal abnormalities, such as translocations, inversions, deletions and duplications, are present in 3% of ASD cases (Vorstman et al. 2006). More recently, an increasing number of rare potentially pathogenic submicroscopic duplications or deletions, the copy number variations (CNV), have been identified in approximately 5%-10% of ASD patients (Szatmari et al. 2007; Marshall et al. 2008; Pinto et al., 2010). Mapping of the boundaries of chromosomal translocations, examination of overlapping regions among duplications or deletions of different sizes and analysis of CNVs have allowed the identification of genes that became strong candidates for ASD, such as *SHANK3*, *NLGN3/4* and *NRXN1* (Durand et al. 2007; Kim et al. 2008; Laumonnier et al. 2004). Thus, chromosomal alterations represent an important etiological mechanism associated with ASD and their molecular and genomic analysis is a useful approach to investigate the genetics of these disorders.

In this report, we describe the clinical features and molecular characterization of chromosomal abnormalities of a female patient with ASD, developmental delay and craniofacial dysmorphism. We also searched for potential candidate genes for the etiology of ASD in this patient based on positional or imprinting effects.

Patient ascertainment and methods

Clinical evaluation

A detailed anamnesis and a three-generation pedigree, as well as a physical examination with special attention to identify any dysmorphic feature or other abnormalities were performed in this case. Blood from the proband and her parents was collected for DNA and karyotype analysis. The study was approved by the Ethical Committee of Bioscience Institute – University of São Paulo.

Karyotype and FISH studies

Metaphases slides were obtained from peripheral blood lymphocytes treated with colchicine and conventional G-banded karyotype was performed for the patient and their parents.

For breakpoints mapping, FISH analysis (Fluorescent *In Situ* Hybridization) was carried out using Bacterial Artificial Chromosomes (BACs) from the RPCI-11 library. BACs were selected from UCSC genome Browser (<http://genome.ucsc.edu/>, hg18) and labeled using nick translation reaction (Lichter et al. 1990). Hybridization of the probes to the patient's metaphase slides was performed following standard procedures. Images were analyzed with the Openlab v.5.5 software and *in silico* analysis were done using the UCSC genome browser and National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) databases. All the genes localized 1Mb distal or proximal from the breakpoint were investigated in the regard of their function, site of expression, interaction with other genes, associated diseases, animal models and relation to neurological function and psychiatric diseases.

SNP-based Microarray analysis

Patient's DNA sample was hybridized to the SNP-array chip HumanHap300 Genotyping BeadChip from Illumina, following the manufacturer's protocol. Data were analyzed using PennCNV (Wang et al., 2007) and QuantiSNP (Colella and Yau et al., 2007) softwares. The CNVs found were compared to the Database of Genomic Variants (<http://projects.tcag.ca/variation/>) and Autism CNV Database (http://projects.tcag.ca/autism_500k/) to identify common and rare variants, as well recurrence of variants in other autistic patients.

Microsatellite analysis

Patient, mother and father were genotyped for the markers D5S1981, D5S416, D5S644, D5S2027, D5S408 using the kit ABI PRISM Linkage Mapping Set version 2.0 (Perkin Elmer, Applied Biosystems). The results were analyzed with GeneMapper Software v4.0 (Applied Biosystems).

Isolation of human dental pulp stem cells

Dental Pulp Stem Cells (DPSCs) lineages were obtained after digestion of dental pulp tissues with a solution of 0,25% trypsin for 30 minutes at 37°C. The cells were cultivated in DMEM/F12 media (Gibco) supplemented with 15% fetal bovine serum (Hyclone), 1% penicillin/streptomycin and 1% non-essential amino acids and maintained under standard conditions (37°C, 5% CO₂).

RNA isolation and quantitative real-time PCR

RNA samples were extracted from DPSCs using the NucleoSpin RNA II (Macherey-Nagel) extraction kit. Samples concentration and quality was evaluated by Nanodrop 1000 and gel electrophoresis. RNA samples were reversed transcribed into cDNA using the Super Script II First Strand Synthesis System (Invitrogen) according to manufacturer's instructions. Primers were designed using PrimerExpress v. 2.0 software and their specificity was verified by melting curve analysis on 7500 System SDS v. 1.2 Software (Applied Biosystems; Table 1). Reactions were run on an Applied Biosystems 7500 sequence detection system using SYBR-Green Master Mix (Applied Biosystems). Quantitative analysis was performed using the comparative threshold cycle method (Livak & Schmittgen, 2001). The geNorm applet (www.medgen.ugent.be/genorm/) was used to determine the stability of the reference genes *GAPDH*, *HPRT1*, *SDHA* and *HMBS* and generate a normalization factor for the expression values of the target genes. The principles of analysis of geNorm are described on Vandesompele et al., 2002.

Results

Clinical history

The patient, a girl who is currently 10 year-old, was born at term after an uncomplicated pregnancy except for placental infarction at the 30th week. There was no history of medication use or alcohol consumption during pregnancy. At the time of conception, the father was 33 years-old and the mother, 27 years-old and they are not consanguineous. Birth weight and length was 2.355kg and 45cm, respectively, and her Apgar scores were 9 at 1min and 10 at 5min. The parents did not report any case of developmental delay or psychiatric diseases in their first relatives.

The first signs of developmental problems noted by the parents were hypotonia, motor delay and excessive crying at night. She sat without support at 8 months of age, walked at 24 months and still suffers from lack of sphincter control. No alterations were found in neuroimaging exams (cranial CT scan and brain MRI). She has lack of spoken language, delay in social behavioral development but absence of repetitive or stereotyped conducts. Thus, on autism evaluation using CARS, she met the DSM-IV criteria for pervasive developmental disorder not otherwise specified (PDDNOS), one of the categories within the ASDs.

On physical examination the patient shows dysmorphic facial features, comprising blepharophimosis, short philtrum, everted lips, prominent central incisors and ears. Ophthalmologic evaluation disclosed high myopia.

Cytogenetic characterization

G-banded karyotype revealed a balanced translocation between chromosome 2 and X [46, XX, t(2;X)(q11;q24)] in the proband (Fig. 1a). Parent karyotypes were normal.

The BAC clone RP11-34G16 spans the breakpoint on chromosome 2 (Fig.1b, d). In the region covered by this BAC, there are three transcripts of non-characterized proteins: BC016831, AK 057596 e AL832439.

The BAC clone RP11-42G22 hybridized to both derivative 2 and derivative X as well as to normal X, and BAC RP11-631P19 were found to be distal to the breakpoint (Fig. 1c, e). This result places the breakpoint in a region overlapping the transcript AK123976. There are two other genes in this region, *PEPP-2* (Paired-like homeobox protein PEPP-2) and *OTEX* (paired-like homeobox protein OTEX). We could not confirm if one of these genes was also disrupted because there were no probes available to narrow down the breakpoint area.

Microarray data revealed that the patient is homozygous for all the SNP markers on chromosome 5, suggesting a uniparental isodisomy (UPD) on this chromosome (Fig. 2a). Patient and parents were genotyped for five microsatellite markers, distributed along the entire chromosome, which showed that the isodisomy was maternally inherited (Fig. 2b). Analysis of SNP array data does not revealed any copy number variation in the patient.

Expression studies

We selected functionally relevant genes near the breakpoints (*UBE2A* and *GLUD2*) or that are possible targets of parental imprinting effect on chromosome 5 (*GABRB2* and *CDH18*) for expression analysis by qPCR. However, due to low expression levels in DPSC, we were unable to investigate *GLUD2*, *GABRB2* and *CDH18*. qPCR analysis showed that expression levels of *UBE2A* in the studied patient are not significantly different from the controls (Normalized expression values – patient: 1.02; controls: 1.22 ± 0.22 ; Mann-Whitney test $p=0.78$).

Discussion

We identified a girl with ASD who has a *de novo* balanced translocation involving the chromosomes 2q11 and Xq24. FISH analysis revealed that the region that contains the breakpoint on chromosome 2 overlap the transcripts BC016831, AK 057596 e AL832439, which are yet very poorly characterized, and we were unable to evaluate their importance for the ASD phenotype. On the other hand, we have demonstrated the disruption of the transcript AK123976 on chromosome X, but it was not possible to exclude if the other two genes located in the breakpoint area, *PEPP-2* and *OTEX*, were also disrupted. Unfortunately these genes are not expressed in DPSC, the available cells that we had from the patient, and therefore, we were not able to elucidate this question.

It is possible that this translocation disrupts regulatory elements important to control the surrounding genes of the breakpoints region (Fenton et al., 2006; Cinquetti et al., 2008). We notice that there are potential candidates near the chromosome X breakpoint: *UBE2A* at 468kb and *GLUD2*, at 845kb distal. Nonsense mutation in *UBE2A* seems to be a cause of mental retardation (Nascimento et al., 2006). This gene encodes an ubiquitin-conjugating enzyme (E2), which interacts with *UBE3A*, the gene responsible for Angelman Syndrome, a phenotype that frequently presents ASD as comorbidity (Veltman et al., 2005). On the other hand, *GLUD2* encodes the enzyme glutamate dehydrogenase 2, which is expressed only in the brain and testis. There are several lines of evidence that implicate glutamatergic neurotransmission system in ASD etiology. A functional mutation was identified in the gene *GluR6* in an autistic patient and positive association results were found between glutamate receptor genes and ASD (Jamain et al., 2002; Shuang et al., 2004; Serajee et al., 2003). As *GLUD2* is not abundantly transcribed in DPSC, we were able to test only *UBE2A* expression levels in DPSC, which was similar in patient and the controls. Considering the mapping position of these genes and the unaltered expression levels of *UBE2A* in this patient, it is very likely that the translocation is not affecting their regulation.

It was also very interesting that the patient in our study has a maternal isodisomy on chromosome 5. To our knowledge, this represents the second case in the literature of UPD on the entire chromosome 5, as a first report on paternal isodisomy was described in a boy with spinal muscular atrophy (SMA) (Brzustowicz et al. 1994), a disorder mostly caused by homozygous deletions at the *SMN1* gene, located at 5q11.2-q13.3 (Matthijs et al. 1996). Thus, it was suggested that SMA in this boy was probably caused by the transmission of two copies of a paternal defective gene, instead of parental imprinting effects, since the patient does not present any other developmental abnormalities.

A case of paternal segmental isodisomy on chromosome 5q32-qter was identified in a patient diagnosed with childhood onset schizophrenia (COS) (Seal et al. 2006), a disorder that presents clinical symptoms and etiological mechanisms that overlaps with ASD (Duarand et al., 2007; Ching et al., 2010; Gauthier et al., 2010). In the region involved in the segmental isodisomy seen in the COS patient, more exactly on chromosome 5q34-q35.1, there is a cluster of gamma-aminobutyric acid (GABA) receptor subunit genes: *GABRB2*, *GABRA6*, *GABRA1*, *GABRG2*, and *GABRP*. GABAergic system has been implicated in the etiology of autism and schizophrenia (Schmitz et al., 2005; Ma et al., 2005; Fatemi et al., 2009; Gonzales-Burgos et al., 2010). Also, recently Pun and colleagues (2011) demonstrated that *GABRB2* is associated to schizophrenia and is under parental imprinting effect. Thus, it is reasonable to propose that imprinting effects caused by the uniparental disomy can be leading to alterations in the level of expression of *GABRB2*, which in turn, can be contributing for the phenotype presented by the reported patient.

A prediction computational analysis showed that *CDH18* is probably under paternal imprinting on chromosome 5 (Luedi et al. 2007). This gene encodes a type II classical cadherin molecule, expressed largely in central nervous system, and it is involved in synaptic adhesion, axon guidance and outgrowth (Kools et al., 1999; Shimoyama et al., 1999). Several lines of evidence are showing that neuronal adhesion molecules can have a role in ASD pathology and cadherin genes are among them (reviewed in Betancur et al., 2009). In a genome-wide association study, six polymorphisms between *CDH10* and *CDH9* on chromosome 5p14 have shown to be strongly associated to ASD, with p-values as lower as 10^{-7} (Wang et al. 2009). Also, studying ASD families in which the parents were consanguineous, one of the largest linked homozygous deletions identified by Morrow and colleagues (2008) was located near Protocadherin 10 (*PCDH10*) gene. This gene, also part of cadherin family genes, is involved in normal forebrain axon outgrowth and its expression is up-regulated in response to membrane depolarization of hippocampal neurons (Uemura et al., 2007). Although we were not able to test the expression levels of these two genes, it is possible that they are deregulated in our patient.

To our knowledge, this is the first report of maternal isodisomy on entire chromosome 5. Considering that paternally inherited UPD on chromosome 5 was not associated with any ASD clinical sign, we suggest two hypotheses to explain why UPD on chromosome 5 would be leading to ASD in the present studied case:

- (1) Imprinting effects in genes on chromosome 5 can only lead to ASD if the UPD is maternally inherited: ASD would be caused by upregulation of genes that are under paternal imprinting effects or downregulation of genes that are under maternal imprinting effects; or
- (2) Recessive mutations in genes that cause ASD are present in the maternal chromosome inherited by this girl.

The use of other cell types to investigate the transcriptional levels of the proposed candidate genes (*GABRB2* and *CDH18*) and next generation sequencing of chromosome 5, specially the region 5q32-qter, involved in a case of paternal segmental isodisomy in a patient with COS, can help to elucidate these questions.

As we cannot yet exclude the possible involvement of the transcripts disrupted by the breakpoints on chromosome 2 and X, there is the possibility that ASD in this patient is caused by the combination of the molecular results caused by the translocation and the UPD on chromosome 5, which would characterize this case as an example of polygenic effects on ASD etiology.

Acknowledgments

We would like to thanks the patient and her family, as well as Cassio Eduardo Rapozo do Amaral for their contribution for this study. This work was supported by CNPq, FAPESP and MCT grants.

References

- Betancur, C., Sakurai, T., and Buxbaum, J. D. (2009). The emerging role of synaptic cell-adhesion pathways in the pathogenesis of autism spectrum disorders. *Trends in neurosciences* 32, 402-12.
- Brzustowicz LM, Allitto BA, Matseoane D, Theve R, Michaud L, Chatkupt S, Sugarman E, Penchaszadeh GK, Suslak L, Koenigsberger MR, et al. (1994). Paternal Isodisomy for

- Chromosome 5 in Muscular Atrophy Child with Spinal. *Journal of Medical Genetics*, 54(3):482-8.
- Ching MS, Shen Y, Tan WH, Jeste SS, Morrow EM, Chen X, Mukaddes NM, Yoo SY, Hanson E, Hundley R, Austin C, Becker RE, Berry GT, Driscoll K, Engle EC, Friedman S, Gusella JF, Hisama FM, Irons MB, Lafiosca T, LeClair E, Miller DT, Neessen M, Picker JD, Rappaport L, Rooney CM, Sarco DP, Stoler JM, Walsh CA, Wolff RR, Zhang T, Nasir RH, Wu BL; Children's Hospital Boston Genotype Phenotype Study Group. (2010). Deletions of NRXN1 (neurexin-1) predispose to a wide spectrum of developmental disorders. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 153B(4):937-47.
- Cinquetti R, Badi I, Campione M, Bortoletto E, Chiesa G, Parolini C, Camesasca C, Russo A, Taramelli R, Acquati F. (2008). Transcriptional deregulation and a missense mutation define ANKRD1 as a candidate gene for total anomalous pulmonary venous return. *Hum Mutation* 29(4):468-74.
- Colella S, Yau C, Taylor JM, Mirza G, Butler H, Clouston P, Bassett AS, Seller A, Holmes CC, Ragoussis J. (2007). QuantiSNP: an Objective Bayes Hidden-Markov Model to detect and accurately map copy number variation using SNP genotyping data. *Nucleic Acids Res*. 35(6):2013-25.
- Durand CM, Betancur C, Boeckers TM, Bockmann J, Chaste P, Fauchereau F, Nygren G, Rastam M, Gillberg IC, Anckarsäter H, Sponheim E, Goubran-Botros H, Delorme R, Chabane N, Mouren-Simeoni MC, de Mas P, Bieth E, Rogé B, Héron D, Burglen L, Gillberg C, Leboyer M, Bourgeron T. (2007). Mutations in the gene encoding the synaptic scaffolding protein SHANK3 are associated with autism spectrum disorders. *Nat Genet*. 39(1):25-7.
- El-Fishawy, P., and State, M. W. (2010). The genetics of autism: key issues, recent findings, and clinical implications. *The Psychiatric clinics of North America* 33, 83-105.
- Fatemi SH, Reutiman TJ, Folsom TD, Thuras PD. (2009). GABA(A) receptor downregulation in brains of subjects with autism. *J Autism Dev Disord*. 39(2):223-30.
- Fenton JA, Schuurin E, Barrans SL, Banham AH, Rollinson SJ, Morgan GJ, Jack AS, van Krieken JH, Kluin PM.(2006). t(3;14)(p14;q32) results in aberrant expression of FOXP1 in a case of diffuse large B-cell lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer* 45(2):164-8.
- Fombonne, E. (2009). Epidemiology of pervasive developmental disorders. *Pediatric research* 65, 591-8.

- Gauthier J, Champagne N, Lafrenière RG, Xiong L, Spiegelman D, Brustein E, Lapointe M, Peng H, Côté M, Noreau A, Hamdan FF, Addington AM, Rapoport JL, Delisi LE, Krebs MO, Joobar R, Fathalli F, Mouaffak F, Haghighi AP, Néri C, Dubé MP, Samuels ME, Marineau C, Stone EA, Awadalla P, Barker PA, Carbonetto S, Drapeau P, Rouleau GA; S2D Team. (2010). De novo mutations in the gene encoding the synaptic scaffolding protein SHANK3 in patients ascertained for schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107(17):7863-8.
- Gonzalez-Burgos G, Hashimoto T, Lewis DA.(2010). Alterations of cortical GABA neurons and network oscillations in schizophrenia. *Curr Psychiatry Rep*. 12(4):335-44. Review.
- Jamain S, Betancur C, Quach H, Philippe A, Fellous M, Giros B, Gillberg C, Leboyer M, Bourgeron T; Paris Autism Research International Sibpair (PARIS) Study. (2002) Linkage and association of the glutamate receptor 6 gene with autism. *Mol Psychiatry* 7(3):302-10.
- Kim HG, Kishikawa S, Higgins AW, Seong IS, Donovan DJ, Shen Y, Lally E, Weiss LA, Najm J, Kutsche K, Descartes M, Holt L, Braddock S, Troxell R, Kaplan L, Volkmar F, Klin A, Tsatsanis K, Harris DJ, Noens I, Pauls DL, Daly MJ, MacDonald ME, Morton CC, Quade BJ, Gusella JF. (2008). Disruption of neurexin 1 associated with autism spectrum disorder. *Am J Hum Genet*. 82(1):199-207.
- Kools P, Vanhalst K, Van den Eynde E, van Roy F. (1999). The human cadherin-10 gene: complete coding sequence, predominant expression in the brain, and mapping on chromosome 5p13-14. *FEBS Lett*. 452(3):328-34.
- Laumonnier F, Bonnet-Brilhault F, Gomot M, Blanc R, David A, Moizard MP, Raynaud M, Ronce N, Lemonnier E, Calvas P, Laudier B, Chelly J, Fryns JP, Ropers HH, Hamel BC, Andres C, Barthélémy C, Moraine C, Briault S. (2004). X-linked mental retardation and autism are associated with a mutation in the NLGN4 gene, a member of the neuroligin family. *American journal of human genetics* 74, 552-7.
- Lichter, P., Tang, C. J., Call, K., Hermanson, G., Evans, G. a, Housman, D., and Ward, D. C. (1990). High-resolution mapping of human chromosome 11 by in situ hybridization with cosmid clones. *Science* 247, 64-9.
- Livak KJ, Schmittgen TD. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods*. 25(4):402-8.
- Luedi, P. P., Dietrich, F. S., Weidman, J. R., Bosko, J. M., Jirtle, R. L., and Hartemink, A. J. (2007). Computational and experimental identification of novel human imprinted genes. *Genome research* 17, 1723-30.

- Ma DQ, Whitehead PL, Menold MM, Martin ER, Ashley-Koch AE, Mei H, Ritchie MD, DeLong GR, Abramson RK, Wright HH, Cuccaro ML, Hussman JP, Gilbert JR, Pericak-Vance MA. (2005). Identification of significant association and gene-gene interaction of GABA receptor subunit genes in autism. *Am J Hum Genet.* (3):377-88.
- Marshall, C. R. et al. (2008). Structural Variation of Chromosomes in Autism Spectrum Disorder. *Journal of Human Genetics*, 82(2):477-488.
- Matthijs, G., Schollen, E., Legius, E., Devriendt, K., Goemans, N., Kayserili, H., Apäk, M. Y., and Cassiman, J. J. (1996). Unusual molecular findings in autosomal recessive spinal muscular atrophy. *Journal of medical genetics* 33, 469-74.
- Morrow EM, Yoo SY, Flavell SW, Kim TK, Lin Y, Hill RS, Mukaddes NM, Balkhy S, Gascon G, Hashmi A, Al-Saad S, Ware J, Joseph RM, Greenblatt R, Gleason D, Ertelt JA, Apse KA, Bodell A, Partlow JN, Barry B, Yao H, Markianos K, Ferland RJ, Greenberg ME, Walsh CA (2008). Identifying autism loci and genes by tracing recent shared ancestry. *Science* 321, 218-23.
- Nascimento RM, Otto PA, de Brouwer AP, Vianna-Morgante AM. (2006). UBE2A, which encodes a ubiquitin-conjugating enzyme, is mutated in a novel X-linked mental retardation syndrome. *Am J Hum Genet.* 79(3):549-55.
- Pinto, D. et al. (2010). Functional impact of global rare copy number variation in autism spectrum disorders. *Nature*, 466(7304):368-72.
- Pun FW, Zhao C, Lo WS, Ng SK, Tsang SY, Nimgaonkar V, Chung WS, Ungvari GS, Xue H. (2011) Imprinting in the schizophrenia candidate gene GABRB2 encoding GABA(A) receptor beta(2) subunit. *Mol Psychiatry.* (5):557-568.
- Seal, J. L. et al. (2006). Segmental uniparental isodisomy on 5q32-qter in a patient with childhood-onset schizophrenia. *Journal of medical genetics* 43, 887-92.
- Schmitz C, van Kooten IA, Hof PR, van Engeland H, Patterson PH, Steinbusch HW. (2005). Autism: neuropathology, alterations of the GABAergic system, and animal models. *Int Rev Neurobiol.* 71:1-26.
- Serajee FJ, Zhong H, Nabi R, Huq AH. (2003). The metabotropic glutamate receptor 8 gene at 7q31: partial duplication and possible association with autism. *J Med Genet.* 40(4):e42.

- Shimoyama Y, Takeda H, Yoshihara S, Kitajima M, Hirohashi S. (1999). Biochemical characterization and functional analysis of two type II classic cadherins, cadherin-6 and -14, and comparison with E-cadherin. *J Biol Chem.* 274(17):11987-94.
- Shuang M, Liu J, Jia MX, Yang JZ, Wu SP, Gong XH, Ling YS, Ruan Y, Yang XL, Zhang D. (2004) Family-based association study between autism and glutamate receptor 6 gene in Chinese Han trios. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 131B(1):48-50.
- Szatmari, P. et al. (2007). Mapping autism risk loci using genetic linkage and chromosomal rearrangements. *Nature genetics* 39, 319-28.
- Uemura M, Nakao S, Suzuki ST, Takeichi M, Hirano S. (2007). OL-Protocadherin is essential for growth of striatal axons and thalamocortical projections. *Nat Neurosci.* 10(9):1151-9.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 18;3(7):RESEARCH0034.
- Veltman MW, Craig EE, Bolton PF. Autism spectrum disorders in Prader-Willi and Angelman syndromes: a systematic review. *Psychiatr Genet.* 2005 Dec;15(4):243-54.
- Vorstman, J. a S., Staal, W. G., Daalen, E. van, Engeland, H. van, Hochstenbach, P. F. R., and Franke, L. (2006). Identification of novel autism candidate regions through analysis of reported cytogenetic abnormalities associated with autism. *Molecular psychiatry* 11, 1, 18-28.
- Wang K, Li M, Hadley D, Liu R, Glessner J, Grant SF, Hakonarson H, Bucan M. (2007). PennCNV: an integrated hidden Markov model designed for high-resolution copy number variation detection in whole-genome SNP genotyping data. *Genome Res.* 2007 Nov;17(11):1665-74.
- Wang, K. et al. (2009). Common genetic variants on 5p14.1 associate with autism spectrum disorders. *Nature* 459, 528-33.

Table 1. Primers used in qPCR analysis of UBE2A, GABRB2, CDH18 and GLUD2 genes

Gene	Primer F	Primer R
GAPDH	TGCACCACCAACTGCTTAGC	GGCATGGACTGTGGTCATG
HPRT1	TGACACTGGCAAAACAATGC	GTCCTTTTCACCCAGCAAGC
HMBS	GGCAATGCGGCTGCAA	GGTAAGGCACGCGAATCAC
SDHA	TGGGAACAAGAGGGCATCTG	CCACCACTGCATCAAATTCATG
UBE2A	CCAGGCTGCTCAGCTGTAC	CGGGGTCAACAATCACCGC
CDH18	TGCGGACCTGCCATGCAGAAG	GCTGCGCCTCAGGGGTGATAAA
GABRB2	TGCATGATGGACCTAAGGAG	CCACGCCAGTAAACTCAATG
GLUD2	GGGAGTCTGAGAAAGCGCAC	AGGTAGCGGTACATCGCGG

Figure 1: Chromosomal translocation (X:2)(q24;q11). **(A)** Partially karyotype and ideogram of the proband's normal and derivatives chromosomes 2 and X. **(B)** Metaphase spreads showing green FISH signal obtained for RP11-34G16 on chromosome 2 (left) and red signal obtained for RP11-42G22 on chromosome X (right). **(C)** Schematic representation of breakpoint area on chromosome 2 (top) and chromosome X (bottom).

CAPÍTULO 4

Identification of TRPC6 gene, a Ca²⁺ ion channel, as a novel candidate gene for autism and modeling neuronal development *in vitro* using patient's cells

Karina Griesi-Oliveira¹, Allan Acab², Daniele Yumi Sunaga¹, Xavier Nicol³, Nicole Davis⁴, Kristin Rose⁴, Yanelli Nunez², Stephan Sanders⁴, Christopher Mason⁴, Estevão Vadasz⁵, Alexander Dietrich⁶, Maria Rita Passos-Bueno¹, Matthew W. State⁴, Alysson Muotri^{2*}.

1 Centro de Estudos do Genoma Humano, Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

2 University of California at San Diego, School of Medicine, Department of Pediatrics, Rady Children's Hospital San Diego, La Jolla, CA, USA

3 University of California, Department of Biology

4 Child Study Center, Yale University School of Medicine, New Haven, Connecticut, USA

5 Instituto de Psiquiatria do Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

6 Institute for Pharmacology and Toxicology, School of Medicine, Philipps-University of Marburg, Marburg, Germany

*Corresponding author: muotri@ucsd.edu

Keywords: autism spectrum disorders, cytogenetic abnormalities, TRPC6, induced pluripotent stem cells

Abstract

Autism spectrum disorders (ASD) are a group of genetically heterogeneous neurodevelopmental diseases. An increasing number of evidences suggest that a large proportion of the ASD cases have a monogenic nature. Here we describe a clear-diagnosed autistic patient who has a *de novo* balanced translocation t(3;11)(p21;q22) that disrupts *TRPC6* gene on chromosome 11. *TRPC6* codifies a Ca^{+2} permeable cation channel implicated in dendritic growth and excitatory synapse formation. We found that relevant genes for biological processes involved in neuronal development and function, such as cytoskeleton dynamics and neuronal adhesion, are differentially expressed in the dental pulp stem cells from this patient. Indeed, we provided evidences that these genes are truly regulated by the pathway downstream *TRPC6*, which involves Ca^{2+} influx through this channel and CREB activation. Making use of cellular reprogramming to convert dental pulp stem cells back to a pluripotent state, we generated induced pluripotent stem cells (iPSC), from this patient and a control. Neurons derived from *TRPC6* gene disrupted patient's iPSC showed a reduced number of glutamatergic synapses compared to control. Finally, we suggest that hyperforin, a drug that specifically activates *TRPC6* channel, could rescue the molecular alterations found in this patient. Since hyperforin is the active component of St. John's wort extract, a supplement used as an anti-depressant, this drug is ready available for clinical tests in ASD patients. Our work places *TRPC6* as a novel candidate gene in ASD, giving support to the crucial role of Ca^{+2} signaling in the etiology of these disorders. Moreover, this study reinforces the use of iPSC as a powerful tool to understand the molecular mechanisms involved in ASD and for drug screening.

Resumo

Os transtornos do espectro autista são um grupo de doenças do neurodesenvolvimento geneticamente heterogêneas. Um número crescente de evidências tem sugerido que uma grande parte dos casos de TEA são causados por alterações em um único gene. Neste trabalho, nós descrevemos um paciente autista portador de uma translocação de novo balanceada $t(3;11)(p21;q22)$, a qual rompe o gene TRPC6 no cromossomo 11. O gene TRPC6 codifica um canal de Ca^{2+} que tem papel no crescimento de dendritos e na formação de sinapses excitatórias. Nós verificamos que genes relevantes para processos biológicos envolvidos no desenvolvimento e funcionamento neuronal, como organização do citoesqueleto e adesão neuronal, estão diferencialmente expressos nas células-tronco de polpa de dente deste paciente. Além disso, nós também demonstramos que estes genes são de fato regulados pela via ativada pelo canal TRPC6, a qual envolve o influxo de Ca^{2+} através deste canal e a fosforilação do fator de transcrição CREB. Utilizando a técnica de reprogramação celular para converter as células-tronco de polpa de dente para um estado pluripotente, nós geramos células iPSC (induced pluripotent stem cells) deste paciente e de um controle. Os neurônios derivados das iPSC do paciente portador do rompimento do gene TRPC6 mostraram um número reduzido de sinapses glutamatérgicas comparado ao controle. Finalmente, sugerimos que a hiperforina, uma droga que ativa o canal TRPC6, poderia resgatar as alterações moleculares encontradas neste paciente. Uma vez que a hiperforina é o componente ativo do extrato da erva de São João, um suplemento utilizado como anti-depressivo, esta droga está prontamente disponível para testes clínicos em pacientes autistas. Nosso trabalho coloca o TRPC6 como um novo candidato para os TEA, dando suporte a hipótese de que vias de sinalização por Ca^{2+} são importantes para a etiologia destes transtornos. Além disso, nosso estudo reforça o uso das iPSC como uma ferramenta eficiente para entender os mecanismos moleculares envolvidos nos TEA bem como para triagem de drogas.

Introduction

Autism spectrum disorders (ASD) are a group of neurodevelopmental diseases that share a common core of symptoms and with estimated prevalence of around 0.6% (Fombonne, 2009). Although it is well established that ASD have a heterogeneous genetic etiology, their inheritance patterns are yet not clear and still much debated (El-Fishawy & State, 2010). There is accumulating evidence that a substantial proportion of the cases are caused by different single genetic variants, which are individually rare, characterizing a monogenic pattern of inheritance. Since many of these variants are extremely rare, the identification of patients with alterations in the same gene requires testing a large number of individuals. Nevertheless, the study of physiological and cellular consequences of rare variants, using animal models and genetic manipulation in culture cells, can help identify molecular mechanisms responsible for alterations in the nervous system, perhaps pointing to common mechanisms for ASD. Moreover, this type of strategy can provide some clues about molecular pathways that are potential targets for future treatment.

Advances on the reprogramming of somatic cells to a pluripotent state by transient over-expression of specific factors (induced pluripotent stem cells, iPSCs) (Takahashi et al., 2007; Yu et al., 2007) provided a novel strategy to explore functional implications of genetic variants found in autistic patients. This approach generates iPSCs that are isogenic to the donor individual and that can be differentiate into neurons (Wernig et al., 2008; Reyes et al., 2008; Dimos et al., 2008). Therefore, the use of iPSCs allows for the development of neuronal models with genomes that are pre-disposed to neurological disorders. Alterations in the phenotype of neurons derived from iPSC have already been found for Rett Syndrome and Schizophrenia patients, and these studies have also demonstrated the usefulness of this model for drug screening (Marchetto et al., 2010; Brennand et al., 2011).

Here we report on the mapping of the breakpoints of a *de novo* balanced translocation found in an autistic patient. One of the breakpoints disrupts *TRPC6*, a gene that codifies voltage-independent, Ca^{+2} permeable cation channels that are important for dendritic growth and excitatory synapse formation in hippocampus (Tai et al., 2008; Zhou et al., 2008). In order to test *TRPC6* involvement in ASD etiology, we analyzed *TRPC6* knockout and heterozygous mice to evaluate the role of this gene on social behavior in these animals. Since Ca^{2+} influx through TRPC6 channel promotes CREB phosphorylation (Tai et al., 2008), we also investigated if the expression of genes

regulated by this transcription factor was altered in patient's dental pulp stem cells (DPSC). Finally, we generated iPSC from DPSC of this patient to study the possible implications of *TRPC6* disruption for the development and function of his neuronal progenitor cells (NPCs) and neurons. Our study strongly suggests that *TRPC6* disruption is the factor responsible for autistic disorder in the studied patient and opens new perspectives to identify novel target drugs for ASD treatment.

Results

Clinical Data

The 8 year-old proband is the only child of non-consanguineous healthy parents. He was born at term after an uncomplicated pregnancy with no malformations recognized at birth. Motor delay and poor responsiveness to his own name, though a normal hearing test, were the first autistic signs noted by the family. He has repetitive behaviors, impairments of communicative and social skills and lack of spoken language. The patient met the DSM-IV criteria for autism disorder according to the evaluation using CARS (Childhood Autism Rating Scale) test. Electroencephalogram and magnetic resonance imaging were normal and the family does not report any other medical conditions. The patient has no dysmorphic features, except for synophrys, which is also present in other members of the father's family. Molecular test for Fragile-X Syndrome was normal. Karyotype analysis revealed a balanced *de novo* translocation (46, XY, t[3;11] [p21;q22]) carried by the proband.

Breakpoints characterization

Through high resolution SNP array analysis, no gain or loss of genetic material was found near the breakpoint areas. Only a duplication (104.225.150bp – 104.339.273bp) on chromosome 14 was identified, which was shown to be a frequent CNV (<http://projects.tcag.ca/variation/>).

Fluorescent *In Situ* Hybridization (FISH) analysis revealed that BAC probes RP11-89F17, RP11-780O20 and RP11-109N8 span the breakpoint on chromosome 3p21, while probes RP11-3F4 and RP11-1006P7 map distal and proximal to the breakpoint, respectively (Fig.1). This allowed us to narrow the breakpoint area to an approximately 15kb region that contains Vpr binding protein (*VPRBP*) gene, indicating that this gene is disrupted.

Breakpoint area on chromosome 11q22 was mapped in a region covered by probes RP11-141E21 and RP11-153K15, distal to RP11-315B9 and proximal to RP11-942D19, indicating that *TRPC6* gene is disrupted (Fig 2a, b). To confirm *TRPC6* disruption we made use of complementary strategies.

Since there is no description of alternative splicing for *TRPC6*, it is expected that all the exons of this gene are equally expressed. Taking into account this rational, we measured the expression levels of exons 4, 6, 12 and 13 in the lymphocytes of the patient, his parents and 6 controls by quantitative real-time PCR (qPCR; Fig. 2c). Using exon 4 as reference, the analysis of the parents and controls revealed that exons 6, 12 and 13 have the same expression level as exon 4. However, in the patient, while exon 6 is expressed in a same level as exon 4, expression levels of exons 12 and 13 are ~50% reduced. Also, upon sequencing all *TRPC6* exons, we found that the patient is heterozygous for a polymorphism in exon 6 (rs12366144) and another one in exon 13 (rs12805398). However, when cDNA from patient's DPSC was sequenced, we identified heterozygosity only for the polymorphism in exon 6 (Fig. 2d). These results indicate that *TRPC6* has biallelic expression and the heterozygosity loss in exon 13 in the cDNA of the patient is explained by the presence of the disrupted chromosome. In this case, *TRPC6* is transcribed up to the breakpoint, which should be located between exons 6 and 12. Importantly, upon sequencing, any deleterious mutation was found in the allele not compromised by the translocation.

Knockout animals demonstrated that VPRBP is involved in DNA replication and cell cycle progression, but there is no direct evidence that altered function of this gene can lead to neurological dysfunctions (McCall et al., 2008). In addition, it has already been described copy number variations (CNVs) involving VPRBP gene in healthy individuals (2 intronic deletions, 5 duplications involving exons; <http://projects.tcag.ca/variation>), which reinforces the idea that the number of copies of this gene per genome does not have an important impact for the human phenotype. On the other hand, *TRPC6*, a Ca^{2+} permeable nonselective cation channel, is involved in neuronal survival, growth cone guidance and spine formation, which makes this gene an interesting functional candidate for ASD (Zhou et al., 2008; Tai et al., 2008; Li et al., 2005; Jia et al., 2007). Based on this data, we decided to focus our further analysis on *TRPC6*.

Mutation Screening of TRPC6

We screened 400 samples of autistic patients from AGRE (Autism Genetic Resource Exchange) repository and 300 samples from our bank at Human Genome Studies Center (Sao Paulo, Brazil) for mutations on *TRPC6* exons. No alterations were identified in these patients. Up to now, there is no CNV in *TRPC6* described in ASD patients (http://projects.tcag.ca/autism_500k) and eleven different CNVs in *TRPC6* are reported on Database of Genomic Variants (<http://projects.tcag.ca/variation/>), but all of them are located within introns.

Behavioral analysis in TRPC6 knockout mice

We investigated *TRPC6* knockout and heterozygous mice in order to evaluate if a lower level of *TRPC6* expression could result in any behavioral alterations related to ASD. Social interaction was assessed using the three-chamber test. No difference in nose-to-nose interaction time ($p=0.96$), time spent in animal chamber ($p=0.96$) or time spent in object chamber ($p=0.83$) was found when comparing the three genotypes. We also measured time spending in repetitive behavior, such as grooming and freezing, in these animals, but again, no significant difference was found ($p=0.35$).

Expression profile of patient's DPSC revealed deregulation of CREB target genes involved in neurogenesis related process

It has been demonstrated that Ca^{2+} influx through *TRPC6* activates a pathway that culminates with CREB phosphorylation (Tai et al., 2008). It is well established that the transcription factor CREB regulates a complex regulatory network involved in memory formation, neuronal development and plasticity in the mammalian brain (Lonze et al. 2002; Chen et al. 2010; Balschun et al. 2003; Dworkin & Mantamadiotis, 2010). In order to verify whether *TRPC6* disruption is deregulating this pathway and, consequently the expression of CREB target genes important for neurodevelopment, we conducted a global expression analysis comparing patient's DPSC expression profile against 6 control samples. DPSCs have an ectodermic neural crest origin and they have the potential to differentiate into neuronal tissue upon induction (Miura et al., 2003; d'Aquino et al., 2009). In view of the technical difficulties to obtain a considerable number of lineages of iPSC derived neuronal cells, we considered adequate the use of DPSC to test our hypothesis.

We identified 67 annotated genes as differentially expressed between the patient and controls ($p < 0.05$; Table 1). Evidences for CREB regulation was found for 15 out of these 67 differentially expressed genes (DEGs) accordingly to the *CREB target genes database* (<http://natural.salk.edu/CREB/>). Notably, almost half of these CREB target genes have important roles related to neurogenesis, such as *EPHA4* and *NPTX1*, the cytoskeleton filaments *MAP2* and *INA* and the cell adhesion molecules *DSP*, *PCDH10* and *CLDN11*. These seven above listed CREB target genes additionally to *SEMA3A* and *CDH6*, which are functionally relevant but apparently not regulated by CREB, were evaluated by quantitative real-time PCR (qPCR) to validate microarray experiments. We performed these analyses with the sample of the TRPC6 disrupted patient and a new set of 5 controls.

We verified by qPCR that the expression of the genes *INA*, *CDH6*, *MAP2* and *CLDN11* in the TRPC6 disrupted patient is deregulated in comparison to the controls in the same direction as the observed in the microarray analysis ($p < 0.05$). These findings are of particular relevance as we have used a new set of controls. The expression of *DSP* is also significantly deregulated in the TRPC6 disrupted patient as compared to controls, but in opposite direction to the one seen in the microarray studies.

In order to further validate our hypothesis that TRPC6 pathway compromising is causing a deregulation of gene transcription in this patient, we treated a control DPSC culture with hyperforin, a TRPC6 activator (Leuner et al., 2007), and measured the expression levels of *SEMA3A*, *CDH6*, *EPHA4*, *NPTX1*, *CLDN11*, *MAP2*, and *INA*, along 48h (Figure 3). Using this strategy, if these genes are truly regulated by TRPC6-CREB pathway, we would expect a change in their expression levels in an opposite direction to that found in the TRPC6 disrupted patient. Following 48h of treatment, we found this correlation for the genes *EPHA4*, *CLDN11* and *SEMA3A*, which had their expression significantly reduced, and for *MAP2* and *INA*, which showed an increase of 20 and 10 times, respectively, in their expression (Fig. 3). Therefore, most of the genes were regulated in the expected direction upon hyperforin treatment compared to TRPC6 disrupted patient expression analysis, thus confirming the microarray data and supporting the hypothesis that TRPC6 pathway is regulating their expression.

Generation of iPSC from TRPC6 disrupted patient

In order to confirm if TRPC6 disruption would influence neurogenesis, we generated iPSC from DPSC of the patient and a control sample. Fingerprint analysis using microsatellite markers confirmed that the iPSC lineages were generated from their correspondent DPSC lineages. Patient's iPSC at passage 35 and control iPSC at passage 25 showed exactly the same karyotype as their respective DPSC lineages at passage 5, showing that they are genomic stable. The efficiency of the reprogramming process was verified by a set of tests (Fig. 4). Immunocytochemistry revealed that the iPSC were positive for the pluripotency markers TRA-1-81, SOX2, NANOG and LIN28. A microarray study was performed in order to compare the expression profiles of DPSC, iPSC and human embryonic stem cells (hESC). Among 28966 genes analyzed, 3177 differentially expressed genes were identified in the comparison between DPSC and iPSC+hESC, whereas only 191 genes were differentially expressed between iPSC and hESC. Non-supervised hierarchical clustering analysis clustered iPSC and hESC in a same group while DPSC lineages were combined in a different group. These results demonstrate that the iPSC lineages generated have an expression profile similar to embryonic stem cells and distinct from DPSC. Finally, iPSC clones were subcutaneously injected in nude mice and efficiently generated teratomas, showing that these cells have the potential to give rise to tissues of the three different germ layers.

Neuronal induction of iPSC

To generate neuronal progenitor cells (NPCs) and neurons from iPSC, we used the previously published protocol described in Marchetto et al., 2010. Pieces of iPSCs colonies were grown in suspension for 1 week as embryonic bodies (EBs) in neuronal differentiation conditions. After this period, the EBs were dissociated and plated and expanded as NPCs. These cells were positive for NPCs specific markers, such as Musashi and Nestin. In order to obtain mature neurons, EBs were maintained for more 2 weeks under FGF-free conditions and then the generated neurons were plated and submitted to immunocytochemistry. MAP2 and Tuj1 staining revealed that the cells successfully differentiated into neurons (Figure 5).

TRPC6 does not affect NPCs proliferation

It has been demonstrated that another member of transient receptor potential channels family, TRPC1, is involved in NPC proliferation mediated by FGF (Fiorio Pla et al. 2005). Based on this information, we decided to check if reduction on TRPC6 expression levels would affect cell cycle profile. When we compared TRPC6 disrupted patient's NPCs to control NPCs we did not identify any difference in cell cycle profile, indicating that TRPC6 does not play a role in NPC proliferation (Figure 6).

Calcium influx through TRPC6 is diminished in the patient's cells, leading to less activation of the transcription factor CREB

Once the patient has decreased levels of TRPC6, one could expect that changes in intracellular Ca^{2+} levels caused by the activation of these channels would be altered in patient's cells. To test this hypothesis, we stimulated NPCs from the patient and a control with OAG+FFA (flufenamic acid) or hyperforin+FFA. OAG is an agent known to stimulate TRPC3, TRPC6 and TRPC7 (Hofmann et al. 1999; Okada et al. 1999), whereas hyperforin activates exclusively TRPC6 (Leuner et al. 2007). Moreover, FFA blocks the Ca^{2+} influx through TRPC3 and TRPC7, while increases the amplitude of the currents through TRPC6 (Inoue et al. 2001).

The dynamic changes in intracellular Ca^{2+} levels during activation of TRPC6 channels with these combinations of drugs revealed a significant higher increase of Ca^{2+} influx in the control NPCs compared to the increase obtained in patient's cells (Fig. 7a,b).

The average of maximum Ca^{2+} levels reached in approximately 100 cells analyzed was reduced in about 30% in the patient's NPCs compared to the control sample when these cells are stimulated by OAG ($p < 0.01$) and a 40% decrease was found when hyperforin was used ($p < 0.001$; Fig. 7c,d).

Calcium influx through TRPC6 activates CaMKIV, which in turns, leads to CREB phosphorylation (Tai et al. 2008). We verified that after 15 and 30 minutes of DPSC stimulation with hyperforin+FFA, the control sample has an increase of 47% and 27%, respectively, in the levels of phosphorylated CREB (P-CREB) compared to the basal level with no stimulation. On the other hand, at the same time points after stimulation, the levels of P-CREB in patient's DPSC increases 30% and 13% related to the basal level. This data shows that CREB activation through TRPC6 pathway is impaired in the studied patient, supporting our findings on microarray expression analysis.

TRPC6 reduces the number of glutamatergic synapses

There are several evidences indicating that glutamatergic neurotransmission is involved in ASD etiology (Marchetto et al., 2010; Hagerman et al., 2010; Cuscó et al., 2009). TRPC6 is mainly expressed in glutamatergic synapses and interferes in synapsin 1 clusters density in pre-synaptic sites of hippocampal neurons, suggesting that this gene has a role in the formation of excitatory synapses (Zhou et al, 2008). Thus, we tested if glutamatergic synapses were affected in neurons derived from TRPC6 disrupted patient iPSC. After six weeks of differentiation, we counted the number of Vesicular Glutamate Transporter 1 (VGlut1) punctua in Map2 labeled neurons. TRPC6 disrupted patient's neurons have a significantly lower density of VGlut1 punctua compared to control (Fig. 8). In order to demonstrate that TRPC6 deficiency is enough to explain this phenotype, we knocked down *TRPC6* expression in control neurons using a shRNA against this gene. Control neurons expressing shTRPC6 also presented a lower density of VGlut1 punctua (Fig. 8). Our results suggest that TRPC6 may be a rate-limiting factor in regulating glutamatergic synapse formation and indicate that changes in excitatory synaptic strength may underlie global network alterations in ASD.

Discussion

Every year, new genes are implicated in ASDs and considerable efforts are now focused on understanding the contribution of each one to autism (Bozdagi et al., 2010; Roussignol et al., 2005; Gutierrez et al., 2009). However, the lack of a human model for ASD has slowed our ability to link genetic alterations to individual phenotypes.

Here we report cytogenetic, genetic, cellular and molecular functional studies in cells of an autistic patient who has a balanced chromosomal translocation t(3;11)(p21;q22). The analysis of the breakpoints involved in this chromosomal rearrangement showed that this translocation disrupts two genes, VPBRP at 3p21 and TRPC6 at 11q22.

We did not find in the literature any evidence for VPRBP involvement in neurogenesis. Also, many CNVs in this gene have already been reported in control samples, suggesting that the disruption of this gene might not be critical for the ASD phenotype.

In contrast, the gene found disrupted on chromosome 11, *TRPC6*, is part of a family of voltage-independent, Ca^{2+} permeable and nonselective cation channels with

different physiological functions, especially during CNS development (Jia et al. 2007; Greka et al. 2003; Fiorio Pla et al. 2005). TRPC6 is located in excitatory synapses and its peak of expression in mouse hippocampal neurons is between postnatal day 7 and 28, an important period to synaptogenesis *in vivo* (Tai et al. 2008; Zhou et al. 2008). TRPC6 and TRPC3 channels are responsible for the Ca^{2+} influx necessary for axonal guidance mediated by brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and they play an important role in granule cell survival mediated by this molecule in cerebellum (Li et al. 2005; Jia et al. 2007). Recent studies showed that *TRPC6* is involved in BDNF-mediated spine formation in hippocampus, a brain region involved in memory consolidation, and it is also important for excitatory synapse development (Zhou et al., 2008). An increased number of dendritic tips and dendritic length was seen in hippocampal cultured mice neurons transfected with a *TRPC6* construct and this result was confirmed by *in vivo* studies using transgenic mice overexpressing *TRPC6* (Zhou et al., 2008). These alterations are promoted by the activation of the pathway downstream TRPC6: the Ca^{2+} influx through the channel activates CaMKIV, which in turn, promotes CREB phosphorylation. The implications of *TRPC6* in neuronal processes already implicated in ASD etiology, place *TRPC6* as a strong candidate for these disorders. Thus, we conducted further analysis using different strategies to investigate the functional implications of TRPC6 disruption.

Evaluation of TRPC6 overexpression consequences on mice behavior showed that these animals have an enhanced spatial memory, while *TRPC6* knockout mice showed an alteration on exploratory behavior (Zhou et al., 2008; Beis et al., 2011). We tested *TRPC6* heterozygous and knockout animals for repetitive behavior and sociability, but we did not find any difference compared to the wild type animals. However, it is important to highlight that insights provided by mouse models are limited due to the intrinsic species differences and have only partially contributed to ASD understanding (Silverman et al., 2010). Thus, an apparently normal behavior phenotype of the TRPC6 knockout mice should thus be interpreted with caution and points towards the importance to develop better tools to evaluate the functional relevance of genes in humans. Therefore, considering that autism is a neurodevelopmental disorder and the nervous human system is more complex than in mice, we decided to perform further analyses in human cells to better explore the functional consequences of *TRPC6* disruption.

Gene expression analysis of patient's DPSC revealed the deregulation of important genes related to neurodevelopment. Interestingly, there are evidences that the transcription factor CREB, a downstream effector of TRPC6, regulates most of these functionally relevant DEGs. Still, treating a control sample with hyperforin, a TRPC6 activator, we confirmed that some of these DEGs (*CLDN11*, *EPHA4*, *INA*, *CDH6*, *SEMA3A* and *MAP2*) are truly regulated by TRPC6 pathway.

CLDN11 and *CDH6* are genes that codify cell adhesion molecules (CAMs). Several mutations and CNVs involving CAMs genes such as *SHANK3*, *NLGN3/4* and *NRXN1*, have been identified in autistic patients, indicating that this class of molecules play an important role in ASD etiology (for a review, see Betancur et al., 2009). In fact, these molecules are essential for a lot of processes related to neurogenesis as the interaction between pre- and postsynaptic cells, the maintenance of this connection and the assembling of neurotransmitter receptors and other signaling molecules in the synaptic membrane (Okabe, 2007; Gerrow & El-Husseini, 2006; Scheiffele, 2003). In particular, *CDH6* is a member of cadherin family, a group of genes that has been consistently implicated in ASD (Wang et al., 2009; Morrow et al., 2008).

Cytoskeleton is implicated in neuronal plasticity and neurodevelopment, being important for establishment of dendrites and axons. We identified as DEGs in our analysis two cytoskeleton filaments which are mainly expressed in nervous system, *MAP2* and *INA*, and two other molecules that are involved in the regulation of the dynamic of this cellular structure, *SEMA3A* and *EPHA4*, and confirmed that they are regulated by TRPC6 pathway.

Semaphorin3A acts as a chemorepulsive agent of axonal growth and its ligation to the receptors neuropilin and plexin leads to the activation of a pathway that culminates with cytoskeleton reorganization (Pasterkamp et al., 2003). This gene also has an important role in the pruning of specific projections of hippocampal neurons during newborn period and knockout mice for *Sema3A* have defects in axonal guidance (Bagri et al. 2003; Behar et al. 1996). Our array data showed an increased expression of *SEMA3A* in the patient. Interestingly, loss of *Sema3A* expression in mice leads to proteinuria and malformation of the podocytes (Reidy et al. 2009). These alterations are similar to those found in patients with focal glomerulose disease, a disease caused by a gain-of-function mutation in TRPC6, which increases the Ca^{2+} influx through the channel (Schlöndorff et al. 2006). This data reinforces the hypothesis that TRPC6 channel is involved in the regulation of *SEMA3A* expression.

EPHA4 was found to be upregulated in the patient. The involvement of ephrin receptors family in the synapse formation and plasticity has been extensively demonstrated (for a review, see Murai & Pasquale, 2002). The activation of the receptor EphA4 by its ligand ephA3 leads to the retraction of the dendritic spines, while the inhibition of this interaction causes abnormal dendritic shape and disorganization of hippocampal slices in mice (Murai et al., 2003). Knockout mice for *Epha4* gene have alterations on dendritic spine morphology and the astrocyte of these animals, when challenged by a stimulus that promotes cytoskeleton collapse, showed a slower reorganization of this structure compared to the wild type mice (Murai et al., 2003; Puschmann & Turnley, 2010).

Pescucci and colleagues (2003) identified an autistic patient with some Rett Syndrome symptoms, but without any alteration in *MeCP2* gene, that has a deletion in chromosome 2q34 involving *MAP2* gene. Expression and immunohistochemistry studies showed a diminished expression of this gene in the brain of autistic and Rett Syndrome patients, data that is in accordance to our findings (Mukaetova-Ladinska et al. 2004; Colantuoni et al., 2001).

Knockout mice for α -internexin, the protein codified by *INA*, which is downregulated in patient's cells, do not present any behavioral alterations either any difference in axon growth (Levavasseur et al. 1999). On the other hand, this protein is the main constituent of the neurofilaments inclusions found in patients with Neuronal Intermediated Filament Disease (Cairns et al. 2004). This disease is characterized by fronto-temporal dementia, behavioral and personality alterations, executive dysfunctions and language disturbance, showing the importance of this gene for the function of the neurons.

This data shows that genes regulated by TRPC6 are implicated in cytoskeleton dynamics and neuronal cell adhesion, processes that are important for neurogenesis and that were already shown to be associated to ASD, supporting the role of TRPC6 in the etiology of these disorders. Thus, we decided to explore cells present during human brain development by taking advantage of iPSC modeling.

Previous studies have shown that during development, bFGF-mediated NPC proliferation is significantly dependent on the availability of intracellular Ca^{2+} primordially occurring through voltage independent channels, such as TRPC channels (Fiorio Pla et al., 2005). This observation prompted us to investigate whether *TRPC6*

disruption was interfering in the cell cycle profile of NPCs, but we did not find any difference between the patient and control regarding this aspect.

On the other hand, Ca^{2+} influx through this channel in patient's NPCs is diminished, leading to a lower level of CREB phosphorylation. This data gives further support to our microarray expression analysis findings.

We also confirmed the involvement of TRPC6 in neuronal function studying the neurons derived from *TRPC6* disrupted patient's iPSC. These cells showed a reduced density of VGlut1 punctua compared to controls, indicating that excitatory synapses function may be impaired in this patient. This data is corroborated by the previously work from Zhou and colleagues (2008), which demonstrated that TRPC6 downregulation or overexpression interfere in glutamatergic synapses formation in mice hippocampal neurons. Glutamatergic neurotransmission involvement in ASD etiology is supported by many evidences. Recently, Marchetto and colleagues demonstrated that neurons generated from iPSC from Rett Syndrome patients with different mutations in MeCP2 gene also have a reduced number of glutamatergic synapses. Deregulation of metabotropic glutamate receptor 1/5 (mGluR1/5) pathway in Fragile-X Syndrome is well documented and it has been investigated as a potential target for drug treatment (Bear et al., 2004; Hagerman et al, 2010). Additionally, it was observed a reduction in glutamatergic transmission in Shank3 heterozygous mice and ASD-specific CNVs were found affecting glutamatergic synapse genes (Bozdagi et al. 2010; Cuscó et al. 2009).

Point mutations in TRPC6 do not seem to be common in ASD individuals, as we did not identify any additional genetic alteration in a cohort of 700 patients. Deletion or duplication of *TRPC6* seems also not to be frequent, as none of the previous CGH studies reported alteration in this gene (Pinto et al. 2010; Szatmari et al. 2007; Marshall et al. 2008; Sebat et al. 2007). In a preliminary screening of 70 patients, we also did not detect any alteration in the number of copies of *TRPC6* (unpublished data). As with most of the genes implicated in ASD, mutations in *TRPC6* likely accounts for only a few ASD patients. However, it is possible that deregulation of the downstream pathway activated by this channel, which involves Ca^{2+} signaling and CREB phosphorylation, might be a common mechanism for these disorders. In fact, mutations in different voltage-gated Ca^{+2} channels have been identified in ASD patients and Ca^{+2} -regulated signaling molecules, which are important to dendritic growth and neuronal development, have also been associated to these disorders . Our results places TRPC6 as one more ASD candidate gene that supports the implication of Ca^{2+} signaling in the

etiology of these disorders, reinforcing the hypothesis that ASD is caused by different mutations that deregulates common pathways.

The use of iPSC to model diseases *in vitro* it is not only useful to understand the phenotypic consequences of genetic alterations, as our study demonstrated, but also to search for drugs that can rescue phenotypic abnormalities. Hyperforin is the main active component of St. John's wort, an herb known by its anti-depressive action (Müller, 2003). It is believed that this action is due to inhibition of monoamine neurotransmitters uptake by hyperforin, which is mediated by TRPC6 activation by this drug and *in vitro* studies demonstrated that hyperforin induces axonal growth in a TRPC6-dependent manner (Leuner et al. 2007). These two actions of hyperforin, additionally to our own findings on TRPC6-mediated hyperforin gene regulation, place this drug as a potential candidate to ASD treatment, at least in this studied case. Moreover, St. John's wort extract containing up to 5% of hyperforin has been extensively used to treat depression, showing that this component is not toxic for humans in this concentration. Whether hyperforin treatment can rescue the neuronal phenotype seen *in vitro* and the social and communicative behavior impairments presented by TRPC6 disrupted patient are questions that need further analysis.

Materials and Methods

Patient ascertainment

The proband with the translocation was diagnosed by experienced psychiatrists from Instituto de Psiquiatria (IPq), Hospital das Clínicas, Universidade de São Paulo, according to DSM-IV criteria. Blood samples were collected from patient and his parents for karyotyping and Fragile-X molecular test in our genetic counseling service at Centro de Estudos do Genoma Humano, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo. Medical and family history was also obtained. This project was approved by the Ethics Committee of the Institutes where the study was conducted. After a complete description of the study, written informed consent was signed by the parents.

Analysis of Genomic copy number variations

Genomic DNA was hybridized to the HumanHap300 Genotyping BeadChip from Illumina, according to manufacturer's protocol, to detect possible copy number

variations (CNVs) present in the patient. The data were analyzed using PennCNV (Wang *et al.*, 2007) e QuantiSNP (Colella and Yau *et al.*, 2007) softwares and results were compared to the database of genomic variants (<http://projects.tcag.ca/variation/>) in order to classify the identified CNVs as rare or common variants.

Fluorescent In Situ Hybridization

Chromosomes for Fluorescent *In Situ* Hybridization (FISH) analysis were prepared from colchicine stimulated lymphocytes of the proband. Bacterial Artificial Chromosomes (BACs) covering the genomic regions of interest were selected from the RPCI-11 library (Roswell Park Cancer Institute) via UCSC genome browser (<http://genome.ucsc.edu/>, assembly Mar. 2006, NCBI36/hg18). BACs were fluorescently labeled using nick translation and hybridized to the metaphase spreads using standard protocols (Lichter *et al.*, 1990).

RNA extraction

RNA samples were extracted from lymphocytes, DPSCs and iPSCs by TRIzol reagent (Invitrogen, CA) and treated with Turbo DNase-free (Ambion). Samples concentration and quality was evaluated by Nanodrop 1000 and gel electrophoresis.

Quantitative Real-time PCR

RNA samples were reversed transcribed into cDNA using the Super Script III First Strand Synthesis System (Invitrogen, CA) according to manufacturer's instructions. Reactions were run on an Applied Biosystem 7500 sequence detection system using Syber-green master mix (Applied Biosystems, CA). qRT-PCR primers were designed using PrimerExpress v. 2.0 software (Applied Biosystems, CA) and specificity was verified by melting curve analysis on 7500 System SDS v. 1.2 Software (Applied Biosystems, CA). Sequences of the primers are described in Supplemental Table 1. Quantitative analysis was performed using the comparative threshold cycle method (Livak&Schmittgen, 2001). The geNorm applet (www.medgen.ugent.be/genorm/) was used to determine the stability of the reference genes GAPDH, HPRT1, SDHA and HMBS and generate a normalization factor for the expression values of the target genes. The principles of analysis of geNorm are described on Vandesompele *et al.*, 2002.

For the microarray validation studies, we used one-tailed unpaired t-test with Welch's correction to compare the qRT-PCR expression values obtained for the patient and controls.

A concentration of 10uM of hyperforin was used to treat DPSC of a control sample for 15min, 30min, 1h, 3h, 6h, 24h, and 48h. The samples were run in triplicate and the results were normalized by the values obtained for a non-treated sample.

Mutation Screening of TRPC6

Fourteen pairs of primers were designed to amplify the 13 exons of TRPC6. A first screening for sequence alterations was conducted using dHPLC strategy. Those samples that presented an altered dHPLC pattern were then sequenced.

Western Blotting

Rabbit anti-TRPC6 antibody (ProScience, 1:250), Rabbit anti-VPRBP (Abcam, 1:500), Rabbit anti-CREB (Cell Signalling, 1:500), Rabbit anti-P-CREB (Cell Signalling, 1:500) and Mouse anti-B-actin (Ambion, 1:5000) were used as primary antibodies. Horseradish-peroxidase-conjugated goat anti-Rabbit and goat anti-Mouse (Promega, 1:2000) were used as secondary antibodies. ECL Plus (Amersham) was used for signal detection. Signal intensities were measured using ImageJ and semiquantitative analysis of P-CREB signal intensity was corrected with respect to CREB/b-actin relative quantification.

Behavioral test in mice

The three-chamber test was used to evaluate the social behavior of wild-type, heterozygous and knockout mice for TRPC6. To evaluate repetitive behavior, initially the animal was observed during 10 minutes in the dark and the time spent in grooming behavior was count. After 5 minutes of habituation in a light condition, a small cage with a never-met animal was introduced in one side of the box and, in the other side, it was introduced an empty cage. The time spent in each chamber and the time spent during nose-to-nose interaction between the animals were measured. The data was analyzed using the non-parametric ANOVA test Kruskal-Wallis.

Isolation and culture of human Dental Pulp Stem Cells

Dental Pulp Stem Cells (DPSCs) lineages were obtained as described elsewhere (Costa et al., 2008). Briefly, dental pulp tissues were digested in a solution of 0,25% trypsin for 30 minutes at 37°C. The cells were cultivated in DMEM/F12 media (Gibco) supplemented with 15% fetal bovine serum (Hyclone, TX), 1% penicillin/streptomycin and 1% non-essential amino acids and maintained under standard conditions (37°C, 5% CO₂). DPSC control lineage used to iPSC generation was a kindly gift from Dr. Songtao Shi from University of Southern California.

Generation of iPSC lineages

The induced pluripotent stem cells (iPSC) were obtained from dental pulp stem cells (DPSC) of the patient and a control according to the protocol described in Takahashi et al., 2007. Briefly, overexpression of OCT4, SOX2, KLF4 and c-MYC were induced in DPSC through the transduction of these cells with virus containing these genes. Two days after the transduction, the cells were transferred to a co-culture with murine embryonic fibroblasts (mEFs), maintained with DMEM/F12 (Invitrogen, CA), 20% Knockout Serum Replacement (Invitrogen, CA), 1% non-essential aminoacids, 0,2% beta-mercaptoetanol and treated with 1mM of Valproic acid (Sigma) during 5 days. The iPSC colonies were identified after approximately 2 weeks in this culture system and were transferred to matrigel (BD Biosciences) coated plates and maintained with mTeSR media (Stem Cell Technologies).

Immunocytochemistry

Cells were fixed with PBS containing 4% paraformaldehyde for 10 minutes and then incubated at room temperature for 1h in a blocking solution containing 5% of donkey serum and 0.1% Triton X-100. The incubation with the primary antibodies was done overnight at 4°C, followed by incubation with secondary antibodies (Jackson ImmunoResearch) for 1h at room temperature. Images were captured with a Zeiss microscope and treated with Picasa v.3.8 (Google). Primary antibodies used: TRA-1-81 (1:100, Chemicon); Nanog and Lin28 (1:500, R&D Systems); human Nestin (1:100, Chemicon); Tuj-1 (1:500, Covance); Map2 (1:100; Sigma); VGLUT1 (1:200, Synaptic Systems); GFAP (1:200, Molecular Probes-Invitrogen); Musashi1 (1:200, Abcam).

Teratoma Formation

iPSC colonies from five semi-confluent 100mm dishes ($1-3 \times 10^6$ cells) were harvested after treatment with 0,5mg/ml dispase, pelleted and suspended in 300ul of matrigel. The cells were injected subcutaneously in nude mice. Five to six weeks after the injection, teratomas were dissected, fixed overnight in 10% buffered formalin phosphate and embedded in paraffin. Sections were stained with hematoxylin and eosin for further analysis. Protocols were previously approved by the University of California San Diego Institutional Animal Care and Use Committee.

Fingerprint and Karyotype

Standard G-banding chromosome and DNA fingerprinting analysis was performed by Cell Line Genetics (Madison, WI).

Neuronal Differentiation

The iPSC colonies were plated in matrigel (BD Biosciences) coated plates and kept for 5 days with mTSeR media (Stem Cell Technologies). In the fifth day, the media was changed by N2 media (DMEM/F12 media supplemented with 1x N2 supplement (Invitrogen) and 1uM of dorsomorphin (Tocris). After two days under this condition, the colonies were removed from the plate and cultured in suspension as Embrioid Bodies (EBs) during one week, using N2 media, but with dorsomorphin just in the first day. The EBs were then gently dissociated with accutase (Gibco) and plated in matrigel coated dishes and maintained with NBF media (DMEM/F12 media supplemented with 0.5x N2, 0.5x B7 supplements, 20ng/ml of FGF and 1% penicillin/streptomycin). The rossetes that emerged after 3 or 4 days were manually selected, gently dissociated with accutase and plated in dishes coated with 10ug/ml poli-ornitin and 5ug/ml laminin. This NPCs population was expanded using the NBF media. To differentiate the NPCs into neurons, the FGF was withdrawn from the media and neurons were maintained in this condition, with media changes every 3 or 4 days.

Ca²⁺ influx studies

Intracellular Ca²⁺ levels were measured using Fluo-4AM. The cells were incubated for 45 minutes at 37oC with 2,5uM of Fluo4-AM and then washed with HBSS buffer for x minutes. OAG or hyperforin (a kindly gift from Dr. Willmar Schwabe GmbH & Co, Karlsruhe, Germany) were used in combination with FFA

(Sigma-Aldrich) for TRPC6 activation. The images were taken using the Biorad MRC 1024 confocal system attached to an Olympus BX70 microscope at 6 seconds intervals during 30 minutes. The drugs were applied at the third minute using a perfusion system. A triplicate of each individual was analyzed for each experiment (OAG or hyperforin). The plug-ins MultiMeasure and MeasureStacks from the software ImageJ were used to measure the Ca²⁺ signal intensities.

Microarray studies

For microarray experiments, 100ng of RNA was reverted to cDNA, amplified, labeled and hybridized to the Human Gene 1.0ST chip from Affymetrix, following manufacture's protocol. The chips were scanned by GeneChip® Scanner 3000 7G System and a quality control was processed by Affymetrix® Expression Console™ Software. The data was normalized using the Robust Multi-array Average (RMA) method (Irizarry et al., 2003), and the differentially expressed genes were selected with the SAM method (Significance Analysis of Microarrays, Tusher, et al., 2001). For the selection of DEGs, we used a p-value <0.05 adjusted for the FDR (False Discovery Rate) and 3,000 permutations. Functional annotation, canonical pathways and networks analysis was performed using Ingenuity Pathways (<http://www.ingenuity.com/>). CREB target genes database (<http://natural.salk.edu/CREB/search.htm>) was used in order to check if the DEGs found are regulated by the transcription factor CREB. A detailed description of the database construction can be found in Zhang et al., 2005.

Cell Cycle Analysis

One million NPCs were harvest to single cell suspension with PBS washing buffer (PBS and 1% serum), then fixed in 75% EtOH for at least 2hr at 4oC. After washing twice with washing buffer, cells were stained using 200 micro liters of propidium iodine (PI) solution (20ug/ml propidium iodide, 200ug/ml RNase A and 0.1% Triton X-100). Multiple NPC samples from TRPC6 disrupted patient and controls were analyzed by fluorescence-activated cell sorting (FACS) on a Becton Dickinson LSRI and cell cycle gating was examined using FLOWJO-Flow Cytometry Analysis Software.

Acknowledgments

The work was supported by FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), MCT (Ministério da Ciência e Tecnologia), Emerald Foundation and the National Institutes of Health through the NIH Director's New Innovator Award Program, 1-DP2-OD006495-01.

We would like to thanks the patient and his family for the cooperation in this study; Daniela Franco Bueno and Gerson Shigeru Kobayashi for the microarray control samples data; Maria Carolina Marchetto for the technical support and critical comments on the manuscript; and Dr. Willmar Schwabe GmbH & Co, Karlsruhe, Germany for providing hyperforin.

References

- Bagri, A., Cheng, H.-J., Yaron, A., Pleasure, S. J., and Tessier-Lavigne, M. (2003). Stereotyped pruning of long hippocampal axon branches triggered by retraction inducers of the semaphorin family. *Cell* 113, 285-99.
- Balschun, D., Wolfer, D. P., Gass, P., Mantamadiotis, T., Welzl, H., Schütz, G., Frey, J. U., and Lipp, H.-P. (2003). Does cAMP response element-binding protein have a pivotal role in hippocampal synaptic plasticity and hippocampus-dependent memory? *Journal of neuroscience* 23, 6304-14.
- Bear MF, Huber KM, Warren ST. (2004). The mGluR theory of fragile X mental retardation. *Trends Neurosci.* 27(7):370-7.
- Behar, O., Golden, J. A., Mashimo, H., Schoen, F. J., and Fischman, M. C. (1996). Semaphorin III is needed for normal patterning and growth of nerves, bones and heart. *Nature.* 383(6600):525-8.
- Beis, D., Schwarting, R. K. W., and Dietrich, A. (2011). Evidence for a supportive role of classical transient receptor potential 6 (TRPC6) in the exploration behavior of mice. *Physiology & behavior* 102, 245-50.
- Betancur, C., Sakurai, T., and Buxbaum, J. D. (2009). The emerging role of synaptic cell-adhesion pathways in the pathogenesis of autism spectrum disorders. *Trends in neurosciences* 32, 402-12.

- Bozdagi O, Sakurai T, Papapetrou D, Wang X, Dickstein DL, Takahashi N, Kajiwarra Y, Yang M, Katz AM, Scattoni ML, Harris MJ, Saxena R, Silverman JL, Crawley JN, Zhou Q, Hof PR, Buxbaum JD. (2010). Haploinsufficiency of the autism-associated Shank3 gene leads to deficits in synaptic function, social interaction, and social communication. *Molecular autism* 1, 15.
- Brennand KJ, Simone A, Jou J, Gelboin-Burkhart C, Tran N, Sangar S, Li Y, Mu Y, Chen G, Yu D, McCarthy S, Sebat J, Gage FH. (2011). Modelling schizophrenia using human induced pluripotent stem cells. *Nature*. Epub ahead of print.
- Cairns NJ, Zhukareva V, Uryu K, Zhang B, Bigio E, Mackenzie IR, Gearing M, Duyckaerts C, Yokoo H, Nakazato Y, Jaros E, Perry RH, Lee VM, Trojanowski JQ. (2004). Alpha-Internexin Is Present in the Pathological Inclusions of Neuronal Intermediate Filament Inclusion Disease. *The American journal of pathology* 164, 2153-61.
- Chen, G., Zou, X., Watanabe, H., Deursen, J. M. van, and Shen, J. (2010). CREB Binding Protein Is Required for Both Short-Term and Long-Term Memory Formation. *Journal of Neuroscience* 30, 13066-13077.
- Colantuoni C, Jeon OH, Hyder K, Chenchik A, Khimani AH, Narayanan V, Hoffman EP, Kaufmann WE, Naidu S, Pevsner J. (2001). Gene expression profiling in postmortem Rett Syndrome brain: differential gene expression and patient classification. *Neurobiol Dis.* 8(5):847-65.
- Colella S, Yau C, Taylor JM, Mirza G, Butler H, Clouston P, Bassett AS, Seller A, Holmes CC, Ragoussis J. (2007). QuantiSNP: an Objective Bayes Hidden-Markov Model to detect and accurately map copy number variation using SNP genotyping data. *Nucleic Acids Res.* 35(6):2013-25.
- Costa, A. M., Bueno, D. F., Martins, M. T., et al. (2008). Reconstruction of large cranial defects in nonimmunosuppressed experimental design with human dental pulp stem cells. *The Journal of Craniofacial Surgery*, 19, 204–210.
- Cuscó, I. et al. (2009). Autism-specific copy number variants further implicate the phosphatidylinositol signaling pathway and the glutamatergic synapse in the etiology of the disorder. *Human molecular genetics* 18, 1795-804.
- d'Aquino, R. et al. (2009). Human dental pulp stem cells: from biology to clinical applications. *Journal of experimental zoology. Part B, Molecular and developmental evolution* 312B, 408-15.
- Dimos JT, Rodolfa KT, Niakan KK, Weisenthal LM, Mitsumoto H, Chung W, Croft GF, Saphier G, Leibel R, Goland R, Wichterle H, Henderson CE, Eggan K. (2008). Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science* 321, 1218-21.

- Dworkin S, Mantamadiotis T. Targeting CREB signalling in neurogenesis. *Expert Opin Ther Targets*. 2010 Aug;14(8):869-79. Review.
- El-Fishawy, P., and State, M. W. (2010). The genetics of autism: key issues, recent findings, and clinical implications. *The Psychiatric clinics of North America* 33, 83-105.
- Fiorio Pla, A., Maric, D., Brazer, S.-C., Giacobini, P., Liu, X., Chang, Y. H., Ambudkar, I. S., and Barker, J. L. (2005). Canonical transient receptor potential 1 plays a role in basic fibroblast growth factor (bFGF)/FGF receptor-1-induced Ca^{2+} entry and embryonic rat neural stem cell proliferation. *Journal of neuroscience* 25, 2687-701.
- Fombonne, E. (2009). Epidemiology of pervasive developmental disorders. *Pediatric research* 65, 591-8.
- Gerrow, K. and El-Husseini, A. (2006) Cell adhesion molecules at the synapse. *Front. Biosci.* 11, 2400–2419.
- Greka, A., Navarro, B., Oancea, E., Duggan, A., and Clapham, D. E. (2003). TRPC5 is a regulator of hippocampal neurite length and growth cone morphology. *Nature neuroscience* 6, 837-45.
- Gutierrez RC, Hung J, Zhang Y, Kertesz AC, Espina FJ, Colicos MA. (2009). Altered synchrony and connectivity in neuronal networks expressing an autism-related mutation of neuroligin 3. *Neuroscience* 4;162(1):208-21.
- Hagerman, R., Hoem, G., and Hagerman, P. (2010). Fragile X and autism: Intertwined at the molecular level leading to targeted treatments. *Molecular autism* 1, 12.
- Hofmann, T., Obukhov, a G., Schaefer, M., Harteneck, C, Gudermann, T., and Schultz, G. (1999). Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol. *Nature* 397, 259-63.
- Inoue, R., Okada, T., Onoue, H., Hara, Y., Shimizu, S., Naitoh, S., Ito, Y., and Mori, Y. (2001). The transient receptor potential protein homologue TRP6 is the essential component of vascular $\alpha(1)$ -adrenoceptor-activated Ca^{2+} -permeable cation channel. *Circulation research* 88, 325-32.
- Irizarry, R. A., Hobbs, B., Collin, F., Beazer-Barclay, Y. D., Antonellis, K. J., Scherf, U., Speed, T. P. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostat* 4 (2): 249–264, 2003.
- Jia, Y., Zhou, J., Tai, Y., and Wang, Y. (2007). TRPC channels promote cerebellar granule neuron survival. *Nature neuroscience* 10, 559-67.
- Leuner, K., Kazanski, V., Müller, M., Essin, K., Henke, B., Gollasch, M., Harteneck, Christian, and Müller, W. E. (2007). Hyperforin--a key constituent of St. John's wort specifically activates TRPC6 channels. *FASEB* 21, 4101-11.

- Levavasseur, F., Zhu, Q., and Julien, J.-pierre (1999). No requirement of a-internexin for nervous system development and for radial growth of axons *Franc. Molecular Brain Research* 69, 104-112.
- Li, Y., Jia, Y.-C., Cui, K., Li, N., Zheng, Z.-Y., Wang, Y.-Z., and Yuan, X.-B. (2005). Essential role of TRPC channels in the guidance of nerve growth cones by brain-derived neurotrophic factor. *Nature* 434, 894-8.
- Lichter, P., Tang, C. J., Call, K., Hermanson, G., Evans, G. a, Housman, D., and Ward, D. C. (1990). High-resolution mapping of human chromosome 11 by in situ hybridization with cosmid clones. *Science* 247, 64-9.
- Livak KJ, Schmittgen TD. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods*. 25(4):402-8.
- Lonze, B. E., and Ginty, D. D. (2002). Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. *Neuron* 35, 605-23.
- Marchetto, M. C. N., Carromeu, C., Acab, A., Yu, D., Yeo, G. W., Mu, Y., Chen, Gong, Gage, F. H., and Muotri, A. R. (2010). A Model for Neural Development and Treatment of Rett Syndrome Using Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell* 143, 527-539.
- Marshall, C. R. et al. (2008). Structural Variation of Chromosomes in Autism Spectrum Disorder. *Journal of Human Genetics*, 477-488.
- McCall, C. M., Miliani de Marval, P. L., Chastain, P. D., Jackson, S. C., He, Y. J., Kotake, Y., Cook, J. G., and Xiong, Y. (2008). Human immunodeficiency virus type 1 Vpr-binding protein VprBP, a WD40 protein associated with the DDB1-CUL4 E3 ubiquitin ligase, is essential for DNA replication and embryonic development. *Molecular and cellular biology* 28, 5621-33.
- Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, Shi S. (2003). SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 13;100(10):5807-12.
- Morrow EM, Yoo SY, Flavell SW, Kim TK, Lin Y, Hill RS, Mukaddes NM, Balkhy S, Gascon G, Hashmi A, Al-Saad S, Ware J, Joseph RM, Greenblatt R, Gleason D, Ertelt JA, Apse KA, Bodell A, Partlow JN, Barry B, Yao H, Markianos K, Ferland RJ, Greenberg ME, Walsh CA. Identifying autism loci and genes by tracing recent shared ancestry. *Science*. 2008 Jul 11;321(5886):218-23.
- Mukaetova-Ladinska, E. B., Arnold, H., Jaros, E, Perry, R., and Perry, E. (2004). Depletion of MAP2 expression and laminar cytoarchitectonic changes in dorsolateral prefrontal cortex in adult autistic individuals. *Neuropathology and applied neurobiology* 30, 615-23.
- Müller WE. (2003). Current St John's wort research from mode of action to clinical efficacy. *Pharmacol Res*. 47(2):101-9. Review.

- Murai, K. K., Nguyen, L. N., Irie, F., Yamaguchi, Y., and Pasquale, E. B. (2003). Control of hippocampal dendritic spine morphology through ephrin-A3/EphA4 signaling. *Nature neuroscience* 6, 153-60.
- Murai, K. K., and Pasquale, E. B. (2002). Can Eph Receptors Stimulate the Mind ? Minireview. *Cell* 33, 159-162.
- Okabe, S. (2007) Molecular anatomy of the postsynaptic density. *Mol. Cell. Neurosci.* 34, 503–518.
- Okada, T. et al. (1999). Molecular and functional characterization of a novel mouse transient receptor potential protein homologue TRP7. Ca(2+)-permeable cation channel that is constitutively activated and enhanced by stimulation of G protein-coupled receptor. *The Journal of biological chemistry* 274, 27359-70.
- Pasterkamp RJ, Kolodkin AL. Semaphorin junction: making tracks toward neural connectivity. *Curr Opin Neurobiol* 2003;13:79–89.
- Pescucci C, Meloni I, Bruttini M, Ariani F, Longo I, Mari F, Canitano R, Hayek G, Zappella M, Renieri A. (2003). Chromosome 2 deletion encompassing the MAP2 gene in a patient with autism and Rett-like features. *Clinical genetics* 64, 497-501.
- Pinto, D. et al. (2010). Functional impact of global rare copy number variation in autism spectrum disorders. *Nature*, 1-5.
- Puschmann, T. B., and Turnley, A. M. (2010). Eph receptor tyrosine kinases regulate astrocyte cytoskeletal rearrangement and focal adhesion formation. *Journal of neurochemistry* 113, 881-94.
- Reidy, K. J., Villegas, G., Teichman, J., Veron, D., Shen, W., Jimenez, J., Thomas, D., and Tufro, A. (2009). Semaphorin3a regulates endothelial cell number and podocyte differentiation during glomerular development. *Development (Cambridge, England)* 136, 3979-89.
- Reyes, J. H., O'Shea, K. S., Wys, N. L., Velkey, J. M., Prieskorn, D. M., Wesolowski, K., Miller, J. M., and Altschuler, R. a (2008). Glutamatergic Neuronal Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells after Transient Expression of Neurogenin 1 and Treatment with BDNF and GDNF: In Vitro and In Vivo Studies. *Journal of Neuroscience* 28, 12622-12631.
- Roussignol G, Ango F, Romorini S, Tu JC, Sala C, Worley PF, Bockaert J, Fagni L. (2005). Shank expression is sufficient to induce functional dendritic spine synapses in aspiny neurons. *J Neurosci.* 25(14):3560-70.
- Sebat, J. et al. (2007). Strong association of de novo copy number mutations with autism. *Science (New York, N.Y.)* 316, 445-9.
- Scheiffele, P. (2003) Cell-cell signaling during synapse formation in the CNS. *Annu. Rev. Neurosci.* 26, 485–508.

- Schlöndorff JS, Pollak MR. (2006). TRPC6 in glomerular health and disease: what we know and what we believe. *Semin Cell Dev Biol.* 17(6):667-74.
- Silverman JL, Yang M, Lord C, Crawley JN. (2010). Behavioural phenotyping assays for mouse models of autism. *Nat Rev Neurosci.* 11(7):490-502. Review.
- Szatmari, P. et al. (2007). Mapping autism risk loci using genetic linkage and chromosomal rearrangements. *Nature genetics* 39, 319-28.
- Tai, Y., Feng, S., Ge, R., Du, W., Zhang, X., He, Z., and Wang, Y. (2008). TRPC6 channels promote dendritic growth via the CaMKIV-CREB pathway. *Journal of cell science* 121, 2301-7.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131, 861-72.
- Tusher, V. G., Tibshirani, R., and Chu, G. (2001). Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(9), 5116-5121.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 18;3(7):RESEARCH0034.
- Wang K, Li M, Hadley D, Liu R, Glessner J, Grant SF, Hakonarson H, Bucan M. (2007). PennCNV: an integrated hidden Markov model designed for high-resolution copy number variation detection in whole-genome SNP genotyping data. *Genome Res.* 2007 Nov;17(11):1665-74.
- Wang, K. et al. (2009). Common genetic variants on 5p14.1 associate with autism spectrum disorders. *Nature* 459, 528-33.
- Wernig M, Zhao JP, Pruszak J, Hedlund E, Fu D, Soldner F, Broccoli V, Constantine-Paton M, Isacson O, Jaenisch R. (2008). Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 5856-61.
- Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin II, Thomson JA. (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science.* 318(5858):1917-20.
- Zhang X, Odom DT, Koo SH, Conkright MD, Canettieri G, Best J, Chen H, Jenner R, Herbolsheimer E, Jacobsen E, Kadam S, Ecker JR, Emerson B, Hogenesch JB, Unterman T, Young RA, Montminy M. (2005). Genome-wide analysis of cAMP-response element

binding protein occupancy, phosphorylation, and target gene activation in human tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102(12):4459-64.

Zhou, J., Du, W., Zhou, K., Tai, Y., Yao, H., Jia, Y., Ding, Y., and Wang, Y. (2008). Critical role of TRPC6 channels in the formation of excitatory synapses. *Nature neuroscience* 11, 741-3.

Figure 1. Characterization of the breakpoint on Chromosome 3. (A) Schematic view of the BAC probes used and the surrounding breakpoint area. RP11 probes marked in red span the breakpoint, while the black ones, not. The shared region between probes RP11-89F17, RP11-780O20 and RP11-1006P7 narrow the breakpoint area to a region inside VPRBP gene. (B) FISH imaging showing that RP11-780O20 probe (green signal) binds to normal and derivative chromosome 3 and to derivative chromosome 11, indicating that the probe spans the breakpoint.

Figure 2. Breakpoint characterization on Chromosome 11. (A) Schematic view of BAC probes used and surrounding areas. BACs colored in red were shown to span the breakpoint. Shared region between probes RP11-153K15 and RP11-141E21 places the breakpoint into *TRPC6*. However, due to FISH resolution, it is possible that RP11-942D19 is also spanning the breakpoint, which extends the breakpoint area to a region that starts 10kb from *TRPC6* gene (light blue) (B) FISH image showing BAC probe RP11-153K15 (red markers) bound to normal chromosome 11 and both derivatives chromosomes 3 and 11. (C) qRT-PCR data showing the levels of expression of *TRPC6* exons 6, 12 and 13 relative to exon 4 for the patient, parents and mean of 6 controls. The patient is the only individual that has a decrease of ~50% on the levels of expression of exons 12 and 13. (D) Genotyping of rs12366144 SNP in *TRPC6* exon 6 (left) and rs12805398 SNP in exon 13 (right). The control sample maintains the heterozygosity for both SNPs at the transcriptional level. On the other hand, the patient does not present one of the alleles in exon 13 when the cDNA is sequenced, indicating that *TRPC6* is transcribed until the breakpoint in the disrupted chromosome.

Table 1. Differentially expressed genes between TRPC6 disrupted patient and controls

Gene	Fold change*	Name	Regulation by CREB**	qRT-PCR validation
RGS4	-3.424461441	regulator of G-protein signaling 4	In silico	
PRRX1	-2.374475207	paired related homeobox 1	In silico; arrays	
PTGS2	-3.49316255	prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)	ChIP-on-chip Gosh <i>et al.</i> , 2007	
INA	-2.639988194	internexin neuronal intermediate filament protein, alpha	ChIP-on-chip	0.0198
ITGA7	-3.173058661	integrin, alpha 7	In silico	
NPTX1	-2.855578291	neuronal pentraxin I	In silico	0.0885
ANGPTL4	-3.15182498	angiopoietin-like 4	In silico	
MAP2	-2.789671289	microtubule-associated protein 2	ChIP-on-chip	0.0363
EPHA4	2.362428255	EPH receptor A4	ChIP-on-chip; In silico	0.4305
PMEPA1	-3.901062426	prostate transmembrane protein, androgen induced 1	In silico	
CLDN11	4.066602785	claudin 11	In silico Lui <i>et al.</i> , 2007	0.0005
PCDH10	-4.318180517	protocadherin 10	ChIP-on-chip; In silico	0.3331
ESM1	-5.824585313	endothelial cell-specific molecule 1	In silico	
DSP	-3.879025353	desmoplakin	ChIP-on-chip	0.0001***
FLNC	-2.328384225	filamin C, gamma	in silico	
CLDN1	4.171417178	claudin 1	In silico	
SEMA3A	2.314408538	semaphorin 3A	No evidence	0.1828
CDH6	-2.67546301	cadherin 6, type 2, K-cadherin (fetal kidney)	No data available	0.0418
CFH	3.295805	complement factor H	No evidence	
CTSK	2.538857806	cathepsin K	No evidence	
TNFSF18	2.364541617	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 18	No evidence	
IFIT1	3.0693729	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1	No evidence	
IGF2	2.643577319	insulin-like growth factor 2 (somatomedin A)	No evidence	
CASP1	2.545250054	caspase 1, apoptosis-related cysteine peptidase (interleukin 1, beta, convertase)	No evidence	
CRYAB	-2.865558657	crystallin, alpha B	No evidence	
PDE3A	-3.350362985	phosphodiesterase 3A, cGMP-inhibited	No evidence	
LUM	2.412407948	lumican	No evidence	
EPSTI1	3.159449161	epithelial stromal interaction 1 (breast)	No evidence	

Table 1. Differentially expressed genes between TRPC6 disrupted patient and controls

Gene	Fold change*	Name	Regulation by CREB*	qRT-PCR validation
LTBP2	-2.717385789	latent transforming growth factor beta binding protein 2	No evidence	
VCAM1	4.546975557	vascular cell adhesion molecule 1	No evidence	
ACAN	-4.199956627	aggrecan	No evidence	
CCL2	2.41655874	chemokine (C-C motif) ligand 2	No evidence	
RAB27B	2.89104252	RAB27B, member RAS oncogene family	No evidence	
KYNU	3.411663783	kynureninase (L-kynurenine hydrolase)	No evidence	
EFEMP1	2.641250593	EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1	No evidence	
MX2	2.490495298	myxovirus (influenza virus) resistance 2 (mouse)	No evidence	
MX1	2.63120465	myxovirus (influenza virus) resistance 1, interferon-inducible protein p78 (mouse)	No evidence	
MME	3.182582502	membrane metallo-endopeptidase	No evidence	
PTX3	3.998647561	pentraxin-related gene, rapidly induced by IL-1 beta	No evidence	
PCOLCE2	-3.094230756	procollagen C-endopeptidase enhancer 2	No evidence	
TLR3	3.212189239	toll-like receptor 3	No evidence	
SULT1B1	-4.384388323	sulfotransferase family, cytosolic, 1B, member 1	No evidence	
PLAC8	2.728492911	placenta-specific 8	No evidence	
ASB5	2.862047519	ankyrin repeat and SOCS box-containing 5	No evidence	
AKAP12	-4.129093856	A kinase (PRKA) anchor protein 12	No evidence	
AEFP1	-2.359467987	AE binding protein 1	No evidence	
LRRC17	2.310487698	leucine rich repeat containing 17	No evidence	
CPA4	2.497337774	carboxypeptidase A4	No evidence	
HGF	4.252390982	hepatocyte growth factor (hepapoietin A; scatter factor)	No evidence	
TFPI2	-2.967261549	tissue factor pathway inhibitor 2	No evidence	
PODXL	-3.832320219	podocalyxin-like	No evidence	
PTGS1	-3.737081399	prostaglandin-endoperoxide synthase 1 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)	No evidence	
IFI44L	3.938933542	interferon-induced protein 44-like	No data available	
OLFML3	2.585096521	olfactomedin-like 3	No data available	
C11orf41	-2.524039553	chromosome 11 open reading frame 41	No data available	
C11orf41	-2.756412512	chromosome 11 open reading frame 41	No data available	
FAM111B	-2.387132177	family with sequence similarity 111, member B	No data available	

Table 1. Differentially expressed genes between TRPC6 disrupted patient and controls

Gene	Fold change*	Name	Regulation by CREB*	qRT-PCR validation
C13orf15	2.878825964	chromosome 13 open reading frame 15	No data available	
MYOCD	-3.398938999	myocardin	No data available	
SLFN11	-3.488715196	schlafen family member 11	No data available	
SNORD35A	-2.273343207	small nucleolar RNA, C/D box 35A	No data available	
ABI3BP	-3.714334634	ABI family, member 3 (NESH) binding protein	No data available	
PCDH18	2.508559732	protocadherin 18	No data available	
C4orf49	3.302012711	chromosome 4 open reading frame 49	No data available	
C9orf150	3.202042462	chromosome 9 open reading frame 150	No data available	
LOC554202	-2.481918054	hypothetical LOC554202	No data available	
C9orf150	3.202042462	chromosome 9 open reading frame 150	No data available	

* Logarithmic gene expression difference between TRPC6 disrupted patient and controls

** Evidences of gene transcription regulation by the transcription factor CREB according to the database <http://natural.salk.edu/CREB/search.htm>: Zhang and colleagues (2005) used three different strategies to identify the genes regulated by CREB: in silico analysis, chromatin co-immunoprecipitation followed by microarray analysis (ChIP-on-chip) and expression analysis of genes induced by forskolin (array). The genes for which no evidence of CREB regulation was found are annotated as "no evidence"; those for which no information is available in the adopted data base are annotated as "no data available".

*** DSP gene was found to be downregulated in the patient in microarray analysis, but significantly upregulated compared to the controls in qRT-PCR analysis.

Figure 3. Expression changes of some DEGs found in TRPC6 disruption patient upon hyperforin treatment. In red, the genes that were upregulated in the patient and in green, the ones that were downregulated. Note that upon hyperforin treatment, CLDN11, EPHA4, SEMA3A, INA and MAP2 were regulated in an opposite direction compared to the patient, as expected, since in this case, TRPC6 pathway was overstimulated.

Figure 4. iPSC characterization.

(A) Mesenchymal stem cells emerging from the dental pulp. (B) Established dental pulp stem cells lineage. (C) iPSC colony emerging from the co-culture system with mEFs. (D) Isolated iPSC colony (E) iPSC colony stained for pluripotency markers TRA-1-81 and Nanog. (F) iPSC colony stained for pluripotency markers SOX2 and Lin28. (G) Hematoxylin-eosin stained slices of the teratomas obtained after iPSC injection in nude mice: the presence of tissues of the three different embryonic layers indicates that the DPSCs were fully reprogrammed to a pluripotent state. (H) Karyotypes of TRPC6mut iPSCs and WT iPSCs showing the stable karyotype of these cells after more than 20 passages. (I) Hierarchical cluster obtained from expression microarray data: the iPSCs lineages obtained clustered with hES cells, indicating that these cells have a similar expression profile, while DPSCs lineages clustered all together in a separate group. Three different clones from the patient was used for microarray analysis and all the samples were run in triplicates.

Figure 5. Efficiently generation of NPCs and neurons from iPSC. (A) Embryoid Bodies at fourth day of differentiation, growing in suspension. (B) NPCs emerging from rosettes obtained after EBs plating. (C) NPCs expanded population. (D) Neurons and glial cells after 3 weeks of differentiation from NPCs. (E) NPCs stained for Musashi. (F) NPCs stained for Nestin. (G) Neurons under 4x magnification stained for MAP-2. (H) Neurons under 40x magnification stained for Tuj-1.

Figure 6. NPCs cell cycle analysis. NPCs from TRPC6 disrupted patient and control were stained with propidium iodide and analyzed by flow cytometry in order to determine the DNA content of each cell. The graphic indicates that there is no significant difference between patient and control sample regarding the percentage of cells in G1, S and G2 phases of cell cycle. The data is the average of measurements obtained for three different clones of each sample.

Figure 7. The pathway activated by TRPC6 is downregulated in patient's cells. (A and B) Ca^{2+} influx dynamic through TRPC6 when the channel is activated by OAG+FFA or Hyperforin+FFA, respectively, is clearly reduced in patient's cells. (C and D) The average of maximum Ca^{2+} levels reached in the approximately 100 cells analyzed is reduced in about 30% in the patient's NPCs compared to the control sample when these cells are stimulated by OAG ($p < 0.01$) and a 40% decrease was found when hyperforin is used ($p < 0.001$).

Figure 8. Analysis of glutamatergic synapses. Representative images of neurons stained for VGLUT1 and MAP2. The graphs show that the number of glutamate vesicles in TRPC6 patient neurons are significantly reduced. Control neurons where TRPC6 expression was knocked down by an shRNA also show a reduced number of glutamate vesicles.

CAPÍTULO 5

Expression analysis in dental pulp stem cells of idiopathic autistic patients reveals alterations in important processes for neurogenesis

Karina Griesi-Oliveira¹, Daniele Yumi Sunaga¹, Lucas Alvizi Cruz¹, Estevão Vadasz²,
Maria Rita Passos-Bueno^{1*}.

1 Centro de Estudos do Genoma Humano, Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

2 Instituto de Psiquiatria do Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

Corresponding author: passos@ib.usp.br

Key words: autism spectrum disorders, expression studies, axonal guidance, cytoskeleton

Abstract

The investigation of autism spectrum disorders causes is hampered by the genetic heterogeneity of these neurodevelopmental diseases. However, it has becoming evident that, although genetically heterogeneous, all the different genetic alterations should be implicated in common molecular pathways or biological processes. In this scenario, the search for differentially expressed genes (DEGs) between ASD patients and controls is a good alternative to examine the molecular etiology of such disorders. Here, we employed genome-wide expression analysis to compare the transcriptoma of dental pulp stem cell of idiopathic autistic patients and control samples. We verified that a significant proportion of the identified DEGs are implicated in processes related to neurogenesis. Indeed, we found that these relevant DEGs can be combined in a large network of functional relations, where they also interact with genes that are part of canonical pathways important for neuronal development. Our results also indicate that most of the DEGs identified are involved in cytoskeleton dynamics, suggesting that the regulation of this cellular structure can be a common mechanism of ASD etiology.

Resumo

A investigação das causas dos transtornos do espectro autista (TEA) é dificultada pela heterogeneidade genética destes transtornos. Porém, os achados nos últimos anos têm mostrado que, embora geneticamente heterogêneo, todas as diferentes alterações encontradas nos pacientes autistas devem estar comprometendo mesmas vias ou processos biológicos. Diante deste cenário, a busca por genes diferencialmente expressos (DEGs) entre pacientes com TEA é uma boa alternativa para investigar a etiologia destes transtornos. No presente trabalho, nós utilizamos análises de expressão global por microarrays para comparar o transcriptoma de células-tronco de polpa de dente de pacientes autistas idiopáticos e controles. Nós verificamos que uma proporção significativa dos DEGs identificados estão envolvidos em processos moleculares relacionados a neurogênese. Além disso, verificamos que a maior parte destes DEGs têm interações funcionais entre si, formando uma rede molecular na qual também interagem outros genes que são parte de vias canônicas importantes para o desenvolvimento neuronal. Nossos resultados mostram ainda que muitos dos DEGs identificados estão envolvidos na organização do citoesqueleto, sugerindo que a regulação desta estrutura celular pode ser um mecanismo comum na etiologia dos TEA.

Introduction

Autism Spectrum Disorders (ASD) is a group of neurodevelopmental diseases characterized by a core of symptoms which includes impairments in communication and social skills and stereotyped behavior. Although it is well accepted that ASD have a strong genetic component, their genetic architecture is still much debated. Nowadays, it is believed that common genetic variants may be responsible for part of the cases, characterizing a polygenic inheritance model, and another substantial part might be caused by a single gene, that either has been transmitted in a Mendelian manner or that has undergone a *de novo* mutation (El-Fishawy & State, 2010). Still considering the monogenic cases, the data available in the literature clear shows the existence of allelic and locus heterogeneity for these disorders.

An interesting approach that can deal with the genetic heterogeneity issue is the genome-wide expression studies: using this method, it is not necessary to search for a common genetic alteration, but instead, one can search for pathways and biological processes enriched by differentially expressed genes found between patients and controls. A series of expression analysis has already been done using lymphoblastoid cell lines of autistic patients and some of them have identified differential expression of genes related to neurological functions and central nervous system development (Baron et al., 2006; Hu et al. 2006, 2009a, 2009b; Gregg et al., 2008; Seno et al., 2010).

We performed an expression microarray study with dental pulp stem cells (DPSC) of ASD and control individuals, in order to verify if: a) there is an expression signature in ASD cells and b) if there are any enrichment of biological processes or canonical pathways involved with neurogenesis and neuronal function. The use of dental pulp stem cells (DPSC) might have an advantage over lymphoblastoid cells as they have also an ectodermic origin and they express neuronal markers upon differentiation, therefore, being a model more closely related to nervous tissue than lymphocytes (d'Aquino et al. 2009; Király et al. 2009). We believe that our approach can open new perspective to identify target pathways and molecules that will contribute to the understanding of ASD etiology as well as to be used for drug screening.

Results

DEGs list is enriched by molecules related to processes involved in neurodevelopment

Taking into account the genetic heterogeneity of ASD and its multifactorial model of inheritance at least in a subgroup of patients, we analyzed our microarray data using the statistical method RankProd, since this algorithm permits the identification of genes that are differentially expressed only in a subgroup of either the test or control condition. We identified 381 DEGs between the 7 patients and 6 controls analyzed (“ASD DEGs list”; Table 1). Hierarchical cluster analysis combined patients in a distinct group from controls, showing that autistic individuals have a characteristic expression profile (Fig.1).

Firstly, we verified the number of DEGs expressed in brain tissues. Using the database UP_TISSUE from DAVID tool, we found that a significant proportion of DEGs are expressed in fetal brain (7.6%; $p=1.3 \times 10^{-3}$). When we considered all the categories from UP_TISSUE related to brain tissue (such as hippocampus, cerebellum, substantia nigra, astrocyte, etc), we verified that 83% of the DEGs are expressed in central nervous system regions or cells.

This list of DEGs (ASD DEGs list) was submitted to functional annotation analysis by two different tools, IPA (Ingenuity Pathway Analysis, <http://www.ingenuity.com>) and DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery, <http://david.abcc.ncifcrf.gov>), in order to identify biological functions and canonical pathways significantly enriched by DEGs, as well as to verify possible networks and interactions between the genes.

Among the most enriched biological functions pointed by these analysis there are relevant groups for the studied phenotype, such as “neurological disease” (max p -value= 9.8×10^{-5} , 134 DEGs), “nervous system development and function” (max p -value= 1.27×10^{-4} , 32 DEGs), “neurogenesis” ($p=6.5 \times 10^{-5}$, 12 DEGs), “cell adhesion” ($p=8.1 \times 10^{-5}$, 21 DEGs), a class of molecules that has been extensively related to ASD etiology, and “cellular assembly and organization” (max p -value= 2.21×10^{-6} , 56 DEGs), a category that includes genes related to formation of neurites and axons and cytoskeleton organization.

The most functionally relevant canonical pathways found by these analysis were cell adhesion molecules pathway (DAVID analysis - ratio: 12/652, $p=2.4 \times 10^{-4}$), regulation of actin cytoskeleton (DAVID analysis - ratio 12/364; $p=1.7 \times 10^{-2}$) and

axonal guidance signaling, which was identified by both, IPA and DAVID tools (IPA analysis - ratio: 19/429, $p=1.4 \times 10^{-3}$; DAVID analysis - ratio: 9/375, $p=1.4 \times 10^{-2}$).

Summary of all these data can be found in Table 2 and raw information is detailed in Supplementary Table 1.

Association of putative networks found by IPA shows that DEGs interact with genes involved in canonical pathways possibly implicated in ASD

Among the 25 putative networks built by IPA analysis tool based on functional interactions between the DEGs, 5 networks are enriched by genes related to the previously selected biological functions, namely: cell-to-cell signaling and interaction, cellular assembly and organization, neurological disease and nervous system development and function. We merged all these networks and found that they have cross-interactions (Fig. 2). We run a new core analysis in IPA using the list of genes involved in this merged network (“merged networks list”), which was composed by 107 DEGs and 65 additional molecules/genes. This new analysis highly increased the significance level of enrichment of “axonal guidance signaling” (B-H multiple test corrected p -value $=3.98 \times 10^{-13}$), which was already found in the analysis of ASD DEGs list, and identified new enriched canonical pathways that: (1) are involved in neuronal development and function, such as “Glutamate receptor signaling” and “CREB signaling in neurons”; (2) have in their composition, genes that were already associated to ASD, such as PTEN and MET (McBride et al., 2010; Campbell et al., 2007, 2008); and (3) are implicated in cytoskeleton organization (Table 3).

Functionally relevant DEGs found in an autistic patient with known etiology that involves CREB signaling are also deregulated in idiopathic patients

In our previous work, investigating an autistic patient with disruption of *TRPC6* gene, we verified that expression of genes regulated by the transcription factor CREB, a downstream effector of TRPC6 channel, was altered in this patient. Since one of the enriched canonical pathways identified in the analysis of merged network list was “CREB signaling in neurons”, we examined if there was an overlapping between the DEGs lists obtained in this present study and TRPC6 disrupted patient study. We verified that 38 DEGs are shared between the two lists and, more importantly, all these genes are deregulated in the same direction in both studies. Fourteen out of these 38 DEGs are involved in nervous system development and, interestingly, there are

evidences for CREB regulation for 10 of them (Table 4; Zhang et al., 2005). This data suggest that pathways that control CREB activation are possibly altered in these idiopathic patients.

Microarray analysis validation

In order to validate our results, we investigated if the functionally relevant pathways identified in the analysis of ASD patients would be also enriched by genes that are differentially expressed in patients with a non-neuronal developmental complex disease. Using the same parameters in RankProd analysis, we compared the microarray data from a set of non syndromic cleft lip/palate (NSCL/P) patients, which were cultured in the same conditions as our samples, to our set of controls (data not shown). In the analysis of NSCL/P, it was identified 275 NSCL/P DEGs and only 7 of them were associated to “neurological diseases” category in functional annotation analysis and 4 were associated to “nervous system development and function”. On the other hand, “cell adhesion molecules” category was found as enriched by these DEG list, as well as “cellular assembly and organization”. However, in this last category, most of the genes are associated to organization for cellular replication (BRCA1, CDC6, HELLS, SASS6, XRCC2) and not to cytoskeleton involvement in neurogenesis. Also, no functionally relevant canonical pathway related to neurodevelopment was found as enriched by the DEGs from this list. We also merged all the putative networks identified in this analysis that were enriched by genes from the same categories chosen as relevant for ASD. “Axonal guidance signaling” was the only relevant canonical pathway found as enriched by this analysis, however with a p-value close to the significance threshold (B-H multiple test corrected p value= 0.042), which is strikingly less significant compared to the enrichment level reached with ASD merged networks list (corrected p-value= 3.98×10^{-13}). Therefore, these results show that our findings for ASD patients are consistent.

Discussion

In this study we investigated the expression profile of dental pulp stem cells from idiopathic autistic patients, comparing them to non-affected controls. All the expression studies conducted so far to explore ASD causes have used lymphoblastoid cell lines (LCL). Although LCL is not the ideal cellular type for the study of a neurological

disease, its use is justified especially by the easiness of obtainment and handling, compared to *postmortem* brain tissues, and by studies showing that expression patterns of lymphocytes and nervous tissues are comparable (Sullivan et al., 2006). Here, we demonstrated that DPSC are also a good source of material to explore expression differences in ASD patients, since the great majority (83%) of the genes identified as DEGs in our analysis are expressed in nervous tissue. Moreover, as we already mentioned, DPSC have an ectodermic origin as do the nervous system and express neuronal markers, which makes the use of these cells more attractive in the study of neurological diseases.

Since ASD is considered genetically heterogeneous disorders, it is not necessarily expected that a same group of genes are deregulated in all the patients. Instead, it is more likely that distinct groups of genes are deregulated in each patient, which however, participate in a same regulatory pathway or biological process. Bearing in mind this rationale, we selected the DEGs between patients and controls using the statistical method RankProd, which allows for the identification of genes that are differentially expressed only in a subgroup of one of the conditions (Raj et al., 2010). In fact, using a more stringent statistical method such as SAM (Significance analysis of microarrays), we were unable to identify relevant pathways and biological functions as enriched by DEGs (data not shown). We also have successfully use RankProd in another multifactorial disease, non syndromic cleft lip and palate, suggesting that this is a powerful tool for the analysis of complex disorders (Bueno et al., 2010).

Upon functional annotation analysis, we found that a significant number of genes involved in neurological diseases, cytoskeleton organization, nervous system development and function and cellular adhesion are differentially expressed in ASD patients.

Cellular adhesion molecules have been consistently associated to ASD (for a review, see Betancur et al., 2009). Several mutations and CNVs involving CAMs genes such as SHANK3, NLGN3/4 and NRXN1, have been identified in autistic patients. Also, there is accumulating evidence that cadherin family, a family of CAMs genes, is also important for ASD etiology (Morrow et al. 2008; Wang et al. 2009). In fact, these molecules are essential for a lot of processes related to neurogenesis such as the interaction between pre- and postsynaptic cells, the maintenance of this connection and the assembling of neurotransmitter receptors and other signaling molecules in the synaptic membrane (Okabe, 2007; Gerrow & El-Husseini, 2006; Scheiffele, 2003).

Although we have found a significant number of CAMs genes in the NSCL/P DEGs list, it is important to highlight that this class of molecules are ubiquitously expressed in the organism and cellular adhesion is an inherent process to all cellular types. Therefore, it is possible that this class of molecules is involved in the pathogenesis of ASD and cleft lip/palate and a deeper investigation of the genes found in both analyses are necessary to elucidate this question.

One of the most relevant canonical pathways found as significantly enriched by DEGs in our analysis was axonal guidance signaling. Formation of neuronal connections depends primarily on the growth of axons that migrate until reach their targets and alteration in the pattern of these connections is proposed as one of the etiological mechanisms in ASD (Kolodkin, 1996; Courchesne & Pierce, 2005; Geschwind & Levitt, 2007). Axonal guidance pathway implication in ASD has been consistently verified by several studies using different strategies. By genome-wide expression analysis, for example, an altered expression pattern was already found for ROBO1, ROBO2 (Anitha et al., 2008), SEMA5A (Melin et al., 2006), RUNX3, SEMA4C (Gregg et al. 2008), ADORA2A, GNAS, MARCKS, MYH10, SLIT2, EXT1, NFKB1, OMG, RHOA, DST and FNBP1 (Hu et al. 2009a). Recently, functional annotation analysis also pointed axonal guidance pathway as significantly enriched by genes overlapping ASD-specific copy number variations (Sbacchi et al. 2010). This is an extremely interesting data since it validates our expression findings in a sequence level.

We combined all the putative networks built by IPA that were enriched by DEGs related to cellular assembly, cellular adhesion and neurodevelopment, generating a complex network of molecular interactions. Analysis of the new set of genes obtained after integration of these networks showed that the DEGs found in our expression study interact with other genes that are part of relevant pathways for ASD etiology. “Axonal guidance signaling”, for example, was the highest significant pathway found as enriched in this analysis.

The intricate signaling pathway that promotes axonal guidance involves attractive and repulsive cues, receptors, signal transducers and molecules that regulate cytoskeleton dynamics (Kolodkin, 1996; He et al., 2002; Yamamoto et al., 2002; Nakamoto et al., 2004; Hou et al., 2008). As part of this pathway, there are molecules from semaphorin and ephrin genes families. It is worthy of note that “Semaphorin signaling in neurons” and “Ephrin receptor signaling” were also identified as

significantly enriched by the genes from the merged networks list. Semaphorin and ephrin signaling pathways regulate integrin-mediated cell adhesion, an important process that promotes the translation of external changes into structural modifications within the cell (reviewed in Nakamoto et al., 2004). Indeed, both pathways are also implicated in attraction and repulsion of axons through the regulation of small GTPases, which in turns, promotes cytoskeleton organization (reviewed in Huber et al., 2003).

Besides its importance for axonal guidance, cytoskeleton dynamics regulation is also implicated in dendritic morphogenesis (Sekino et al., 2007; Tada & Sheng, 2006). Interestingly, molecules from semaphorin and ephrin signaling pathway interact with REST, a transcription inhibitor factor known to be regulated by MeCP2 (Kurschat et al., 2006; Zuccato et al., 2007; Abuhatzira et al., 2007). Mutations in MeCP2 are responsible for Rett Syndrome and neurons from these patients have alterations in dendritic spine morphology (Armstrong et al., 1995; Marchetto et al., 2010). This data suggest that ephrin and semaphorin signaling, and consequently axon guidance signaling, can be one of the core pathways affected by different mutation that lead to ASD.

Rett Syndrome patients also have a decreased number of glutamatergic vesicles in their excitatory synapses (Marchetto et al. 2010). Our group has also demonstrated that the same type of abnormality is present in the neurons of an ASD patient who has a disruption of TRPC6 gene. Interestingly, our study showed that ASD DEGs are part of and interact with a significant number of genes involved in “Glutamatergic receptor signaling”. The involvement of glutamatergic neurotransmission in ASD is supported by several other lines of evidence, specially the well documented deregulation of metabotropic glutamate receptor pathway in Fragile-X Syndrome (Bear et al., 2004; Hagerman et al, 2010).

PTEN and HGF signaling, pathways already implicated in ASD, were also identified in the analysis of the merged networks list. Mutations that lead to haploinsufficiency of PTEN gene are estimated to be present in around 5% of the cases of ASD associated to macrocephaly/macrosomy (Lintas et al. 2009). PTEN inactivation in central nervous system leads to excessive dendritic and axonal growth with consequently increased number of synapses (Kwon et al., 2006). Reduced levels of hepatocyte growth factor (HGF) were found in the serum of ASD patients (Russo et al., 2009; Sugihara et al., 2007). Also, protein levels of MET, the tyrosine kinase receptor for HGF, were shown to be decreased in the temporal cortex of autistic individuals and

different studies showed a positive association of MET and other genes of HGF signaling pathway to ASD (Campbell et al., 2007; Sousa et al., 2009; Campbell et al., 2008).

Another canonical pathway found as enriched by merged networks genes list was CREB signaling in neurons. Interestingly, as already mentioned, we recently identified an autistic patient with a chromosomal translocation that disrupts *TRPC6* gene, a non-voltage gated cation channel. CREB is a downstream effector of TRPC6 and, in fact, expression analysis of DPSC revealed that CREB target genes that are involved in neurodevelopment are deregulated in this patient. When we compared DEGs list from the present analysis to the list of TRPC6 disrupted patient study, we found 14 functionally relevant genes shared by both analysis. More importantly, there are evidences of CREB regulation for 10 of these genes.

When we merged the networks enriched by genes related to neurogenesis from NSCL/P DEGs analysis, any canonical pathway relevant for ASD was identified as enriched by this set of genes. This data shows the consistency of our findings and supports the involvement of the putative merged network found in the analysis of ASD DEGs in the etiology of these disorders. Our study shows that ASD patients have an altered expression of genes that are important for neurogenesis and neuronal function. Such alterations can be due to a combination of common genetic variants occurring in the found DEGs or due to rare variants in upstream genes that regulates the transcription of these DEGs. An example that supports this last hypothesis is the CREB signaling pathway, identified in our study as enriched by DEGs and genes that interact with them. CREB regulates a complex regulatory network involved in memory formation, neuronal development and plasticity in the mammalian brain (Lonze et al. 2002; Chen et al. 2010; Balschun et al. 2003; Dworkin & Mantamadiotis, 2010). Furthermore, our group already demonstrated the implication of this pathway in another ASD patient and some of the CREB target genes deregulated in this individual were also found as differentially expressed in the idiopathic patients investigated in the present study.

In summary, most of the genes and canonical pathways identified in our analysis are implicated in cytoskeleton organization. Therefore, our data strongly suggests that cytoskeleton dynamics regulation is an important process for ASD etiology and seems to be mainly compromising axonal guidance. The use of cellular reprogramming to investigate ASD patients' neurons can be used to further investigate this hypothesis. Finally, our study identified a putative network in which most of the functionally

relevant DEGs interacts. Drugs targeting the genes in this network are a source of molecules that can be used for future *in vitro* drug screening studies for ASD. Therefore, the approach employed here can contribute for the identification of possible treatments even without knowing the specific genetic mutations that are leading to ASD in the studied patients.

Material and Methods

Patients ascertainment

All the probands were diagnosed by experienced psychiatrists from Instituto de Psiquiatria (IPq), Hospital das Clínicas, Universidade de São Paulo, according to DSM-IV criteria. Blood samples were collected for Fragile-X molecular test in our genetic counseling service at Centro de Estudos do Genoma Humano, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo. Medical and family history was also obtained. DPSC lineages used as controls were obtained from deciduous teeth of healthy volunteers. This project was approved by the Ethics Committee of the Institutes where the study was conducted. After a complete description of the study, written informed consent was signed by the parents.

Isolation of human dental pulp stem cells

Dental Pulp Stem Cells (DPSCs) lineages were obtained according to previously published protocols (Costa et al., 2008). Briefly, after digestion of dental pulp tissues with a solution of 0,25% trypsin for 30 minutes at 37°C. The cells were cultivated in DMEM/F12 media (Gibco) supplemented with 15% fetal bovine serum (Hyclone), 1% penicillin/streptomycin and 1% non-essential amino acids and maintained under standard conditions (37°C, 5% CO₂).

RNA extraction

RNA samples were extracted using the NucleoSpin RNA II (Macherey-Nagel) extraction kit. Samples concentration and quality was evaluated by Nanodrop 1000 and gel electrophoresis.

Microarray studies

For microarray experiments, 100ng of RNA was reverted to cDNA, amplified, labeled and hybridized to the Human Gene 1.0ST chip from Affymetrix, following

manufacture's protocol. The chips were scanned by GeneChip® Scanner 3000 7G System and a quality control was processed by Affymetrix® Expression Console™ Software. The microarray data was normalized using the Robust Multi-array Average (RMA) method (Irizarry et al., 2003). Differentially expressed genes were selected with the RankProd method, available in the MeV (MultiExperiment Viewer) software package, using the following parameters: p-value <0.0005 adjusted for the FDR (False Discovery Rate) and 4,000 permutations. Functional annotation, canonical pathways and networks analysis was performed using Ingenuity Pathways (<http://www.ingenuity.com/>) and Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) v6.7 (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>). The parameters used in IPA analysis were: molecules per network= 35, networks per analysis=25, only direct relationships between genes and the data sources “Ingenuity Expert Information” and “Ingenuity ExpertAssist Findings”, in which the information has been manually reviewed and curated from full-text scientific publications. Non-supervised hierarchical clustering analysis was performed using MeV, with Spearman's correlation as the distance metric.

Acknowledgements

This study was supported by FAPESP and CNPq. We would like to thanks the oatients and their families; Daniela Franco Bueno and Gerson Shigeru Kobayshi for the control microarray data.

References

- Abuhatzira L, Makedonski K, Kaufman Y, Razin A, Shemer R. (2007). MeCP2 deficiency in the brain decreases BDNF levels by REST/CoREST-mediated repression and increases TRKB production. *Epigenetics*. 2(4):214-22.
- Anitha A, Nakamura K, Yamada K, Suda S, Thanseem I, Tsujii M, Iwayama Y, Hattori E, Toyota T, Miyachi T, Iwata Y, Suzuki K, Matsuzaki H, Kawai M, Sekine Y, Tsuchiya K, Sugihara G, Ouchi Y, Sugiyama T, Koizumi K, Higashida H, Takei N, Yoshikawa T, Mori N. (2008). Genetic analyses of roundabout (ROBO) axon guidance receptors in autism. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 147B(7):1019-27.
- Armstrong D, Dunn JK, Antalffy B, Trivedi R. Selective dendritic alterations in the cortex of Rett syndrome. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1995 Mar;54(2):195-201.
- Balschun, D., Wolfer, D. P., Gass, P., Mantamadiotis, T., Welzl, H., Schütz, G., Frey, J. U., and Lipp, H.-P. (2003). Does cAMP response element-binding protein have a pivotal role in

- hippocampal synaptic plasticity and hippocampus-dependent memory? *Journal of neuroscience* 23, 6304-14.
- Baron, C. a, Liu, S. Y., Hicks, C., and Gregg, J. P. (2006). Utilization of lymphoblastoid cell lines as a system for the molecular modeling of autism. *Journal of autism and developmental disorders* 36, 973-82.
- Bear MF, Huber KM, Warren ST. (2004). The mGluR theory of fragile X mental retardation. *Trends Neurosci.* 27(7):370-7.
- Betancur, C., Sakurai, T., and Buxbaum, J. D. (2009). The emerging role of synaptic cell-adhesion pathways in the pathogenesis of autism spectrum disorders. *Trends in neurosciences* 32, 402-12.
- Bueno, D. F., Sunaga, D. Y., Kobayashi, G. S., Agüena, M., Raposo-Amaral, C. E., Masotti, C., Cruz, L. A., Pearson, P. L., and Passos-Bueno, M. R. (2010). Human Stem Cell Cultures from Cleft Lip/Palate Patients Show Enrichment of Transcripts Involved in Extracellular Matrix Modeling By Comparison to Controls. *Stem cell reviews* 7(2):446-57.
- Campbell DB, D'Oronzio R, Garbett K, Ebert PJ, Mirnics K, Levitt P, Persico AM. (2007). Disruption of cerebral cortex MET signaling in autism spectrum disorder. *Ann Neurol.* 62(3):243-50.
- Campbell DB, Li C, Sutcliffe JS, Persico AM, Levitt P. (2008). Genetic evidence implicating multiple genes in the MET receptor tyrosine kinase pathway in autism spectrum disorder. *Autism Res.* 1(3):159-68.
- Chen, G., Zou, X., Watanabe, H., Deursen, J. M. van, and Shen, J. (2010). CREB Binding Protein Is Required for Both Short-Term and Long-Term Memory Formation. *Journal of Neuroscience* 30, 13066-13077.
- Costa, A. M., Bueno, D. F., Martins, M. T., et al. (2008). Reconstruction of large cranial defects in nonimmunosuppressed experimental design with human dental pulp stem cells. *The Journal of Craniofacial Surgery*, 19, 204–210.
- Courchesne E, Pierce K. (2005). Why the frontal cortex in autism might be talking only to itself: local over-connectivity but long-distance disconnection. *Curr Opin Neurobiol.* 15(2):225-30. Review.
- d'Aquino, R. et al. (2009). Human dental pulp stem cells: from biology to clinical applications. *Journal of experimental zoology. Part B, Molecular and developmental evolution* 312B, 408-15.
- Dworkin S, Mantamadiotis T. Targeting CREB signalling in neurogenesis. *Expert Opin Ther Targets.* 2010 Aug;14(8):869-79. Review.
- El-Fishawy, P., and State, M. W. (2010). The genetics of autism: key issues, recent findings, and clinical implications. *The Psychiatric clinics of North America* 33, 83-105.

- Gerrow, K. and El-Husseini, A. (2006) Cell adhesion molecules at the synapse. *Front. Biosci.* 11, 2400–2419.
- Geschwind DH, Levitt P. (2007). Autism spectrum disorders: developmental disconnection syndromes. *Curr Opin Neurobiol.* 17(1):103-11.
- Gregg JP, Lit L, Baron CA, Hertz-Picciotto I, Walker W, Davis RA, Croen LA, Ozonoff S, Hansen R, Pessah IN, Sharp FR. (2008). Gene expression changes in children with autism. *Genomics* 91, 22-9.
- Hagerman, R., Hoem, G., and Hagerman, P. (2010). Fragile X and autism: Intertwined at the molecular level leading to targeted treatments. *Molecular autism* 1, 12.
- He Z, Wang KC, Koprivica V, Ming G, Song HJ.(2002). Knowing how to navigate: mechanisms of semaphorin signaling in the nervous system. *Sci STKE.* 2002(119):re1.
- Hou ST, Jiang SX, Smith RA. (2008). Permissive and repulsive cues and signalling pathways of axonal outgrowth and regeneration. *Int Rev Cell Mol Biol.* 267:125-81. Review.
- Hu, V. W., Frank, B. C., Heine, S., Lee, N. H., and Quackenbush, J. (2006). Gene expression profiling of lymphoblastoid cell lines from monozygotic twins discordant in severity of autism reveals differential regulation of neurologically relevant genes. *BMC genomics* 7, 118.
- Hu, V. W., Nguyen, Anhthu, Kim, K. S., Steinberg, M. E., Sarachana, T., Scully, M. a, Soldin, S. J., Luu, T., and Lee, N. H. (2009a). Gene expression profiling of lymphoblasts from autistic and nonaffected sib pairs: altered pathways in neuronal development and steroid biosynthesis. *PloS one* 4, e5775.
- Hu, V. W., Sarachana, T., Kim, K. S., Nguyen, Anhthu, Kulkarni, S., Steinberg, E., Luu, T., Lai, Y., and Lee, N. H. (2009b). Gene Expression Profiling Differentiates Autism Case–Controls and Phenotypic Variants of Autism Spectrum Disorders: Evidence for Circadian Rhythm Dysfunction in Severe Autism. *Autism* 2, 78-97.
- Huber AB, Kolodkin AL, Ginty DD, Cloutier JF. (2003). Signaling at the growth cone: ligand-receptor complexes and the control of axon growth and guidance. *Annu Rev Neurosci.* 26:509-63.
- Irizarry, R. A., Hobbs, B., Collin, F., Beazer-Barclay, Y. D., Antonellis, K. J., Scherf, U., Speed, T. P. (2003). Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostat* 4 (2): 249–264, 2003.
- Király, M. et al. (2009). Simultaneous PKC and cAMP activation induces differentiation of human dental pulp stem cells into functionally active neurons. *Neurochemistry international* 55, 323-32. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19576521> [Accessed July 28, 2010].
- Kolodkin AL. (1996). Growth cones and the cues that repel them. *Trends Neurosci.* 19(11):507-13.

- Kurschat P, Bielenberg D, Rossignol-Tallandier M, Stahl A, Klagsbrun M. (2006). Neuron restrictive silencer factor NRSF/REST is a transcriptional repressor of neuropilin-1 and diminishes the ability of semaphorin 3A to inhibit keratinocyte migration. *J Biol Chem.* 281(5):2721-9.
- Kwon CH, Luikart BW, Powell CM, Zhou J, Matheny SA, Zhang W, Li Y, Baker SJ, Parada LF. (2006). Pten regulates neuronal arborization and social interaction in mice. *Neuron* 50:377–88.
- Lintas, C., and Persico, a M. (2009). Autistic phenotypes and genetic testing: state-of-the-art for the clinical geneticist. *Journal of medical genetics* 46, 1-8.
- Lonze, B. E., and Ginty, D. D. (2002). Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. *Neuron* 35, 605-23.
- Marchetto, M. C. N., Carromeu, C., Acab, A., Yu, D., Yeo, G. W., Mu, Y., Chen, Gong, Gage, F. H., and Muotri, A. R. (2010). A Model for Neural Development and Treatment of Rett Syndrome Using Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell* 143, 527-539.
- McBride KL, Varga EA, Pastore MT, Prior TW, Manickam K, Atkin JF, Herman GE. (2010). Confirmation study of PTEN mutations among individuals with autism or developmental delays/mental retardation and macrocephaly. *Autism Res.* 3(3):137-41.
- Melin, M.; Carlsson, B.; Anckarsater, H.; Rastam, M.; Betancur, C.; Isaksson, A.; Gillberg, C.; Dahl, N. Constitutional downregulation of SEMA5A expression in autism. *Neuropsychobiology*, 2006, 54, 64-69.
- Morrow, E. M. et al. (2008). Identifying autism loci and genes by tracing recent shared ancestry. *Science* 321, 218-23.
- Okabe, S. (2007) Molecular anatomy of the postsynaptic density. *Mol. Cell. Neurosci.* 34, 503–518.
- Nakamoto T, Kain KH, Ginsberg MH. (2004). Neurobiology: New connections between integrins and axon guidance. *Curr Biol.* 14(3):R121-3. Review.
- Raj, A., Rifkin, S. A., Andersen, E., & van Oudenaarden, A. (2010). Variability in gene expression underlies incomplete penetrance. *Nature*, 463(7283), 913–918.
- Russo AJ, Krigsman A, Jepson B, Wakefield A. (2009). Decreased Serum Hepatocyte Growth Factor (HGF) in Autistic Children with Severe Gastrointestinal Disease. *Biomark Insights* 4:181-90.
- Sbacchi, S., Acquadro, F., Calò, I., Calì, F., and Romano, V. (2010). Functional annotation of genes overlapping copy number variants in autistic patients: focus on axon pathfinding. *Current genomics* 11, 136-45.
- Scheiffele, P. (2003) Cell-cell signaling during synapse formation in the CNS. *Annu. Rev. Neurosci.* 26, 485–508.

- Seno, M. M. G., Hu, P., Gwadry, F. G., Pinto, D., Marshall, C. R., Cassallo, G., and Scherer, S. W. (2010). Gene and miRNA Expression Profiles in Autism Spectrum Disorders. *Brain research*, 1380:85-97.
- Sekino Y, Kojima N, Shirao T. (2007). Role of actin cytoskeleton in dendritic spine morphogenesis. *Neurochem Int.* 51(2-4):92-104.
- Sousa I, Clark TG, Toma C, Kobayashi K, Choma M, Holt R, Sykes NH, Lamb JA, Bailey AJ, Battaglia A, Maestrini E, Monaco AP; International Molecular Genetic Study of Autism Consortium (IMGSAC). (2009). MET and autism susceptibility: family and case-control studies. *Eur J Hum Genet.* 17(6):749-58.
- Sugihara G, Hashimoto K, Iwata Y, Nakamura K, Tsujii M, Tsuchiya KJ, Sekine Y, Suzuki K, Suda S, Matsuzaki H, Kawai M, Minabe Y, Yagi A, Takei N, Sugiyama T, Mori N. (2007). Decreased serum levels of hepatocyte growth factor in male adults with high-functioning autism. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 31(2):412-5.
- Sullivan PF, Fan C, Perou CM. (2006). Evaluating the comparability of gene expression in blood and brain. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 5,141(3):261-8.
- Tada T, Sheng M. (2006). Molecular mechanisms of dendritic spine morphogenesis. *Curr Opin Neurobiol.* 16(1):95-101.
- Wang, K. et al. (2009). Common genetic variants on 5p14.1 associate with autism spectrum disorders. *Nature* 459, 528-33.
- Yamamoto N, Tamada A, Murakami F. Wiring of the brain by a range of guidance cues. *Prog Neurobiol.* 2002 Dec;68(6):393-407. Review.
- Zhang, X. et al. (2005). Genome-wide analysis of cAMP-response element binding protein occupancy, phosphorylation, and target gene activation in human tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 4459-64.
- Zuccato C, Belyaev N, Conforti P, Ooi L, Tartari M, Papadimou E, MacDonald M, Fossale E, Zeitlin S, Buckley N, Cattaneo E. (2007). Widespread disruption of repressor element-1 silencing transcription factor/neuron-restrictive silencer factor occupancy at its target genes in Huntington's disease. *J Neurosci* 27(26):6972-83.

Figure 1. Hierarchical cluster showing that patients and controls are clustered in different groups

Figure 2. Network generated by the combination of the 5 putative networks enriched by functionally relevant DEGs for ASD, showing the relationships among the DEGs and other non-differentially expressed genes.

Table 1. Differentially expressed genes between idiopathic ASD patients and controls

Affy ID	Gene Symbol	Fold Change	Affy ID	Gene Symbol	Fold Change
8140752	ABC4	1.493806862	7933204	C10orf10	1.331519609
8079153	ABHD5	-1.681052612	7927723	C10orf107	1.213139083
8089145	ABI3BP	-2.021415232	7934185	C10orf54	1.222846902
7985786	ACAN	-2.412205212	7928695	C10orf58	1.203044002
7936968	ADAM12	-1.819704133	7968351	C13orf33	-2.008346602
7905233	ADAMTSL4	1.287772092	8080847	C3orf14	-1.759038023
8069178	ADARB1	1.454855379	8102831	C4orf49	1.588252995
8040774	AGBL5	1.251611246	8113504	C5orf13	-1.671194963
8121277	AIM1	1.288164575	8111952	C5orf28	-1.925729305
8122807	AKAP12	-2.384964052	8105084	C7	1.525579465
7941961	ALDH3B1	1.244273692	8135734	C7orf58	1.48413942
8174576	AMOT	1.233613971	8150978	CA8	1.211455528
8139131	AMPH	1.494428616	7997139	CALB2	-1.987061472
8025402	ANGPTL4	-1.629398367	8053417	CAPG	1.661645908
7934979	ANKRD1	-2.795608136	7932082	CCDC3	-1.740730261
8132318	ANLN	1.279439024	8023401	CCDC68	1.686604958
7926786	APBB1IP	1.410066109	7980828	CCDC88C	1.223376334
8020141	APCDD1	1.871620644	8105828	CCNB1	1.530395512
8073062	APOBEC3B	1.13006585	7983969	CCNB2	1.219560106
8073068	APOBEC3C	1.751539646	8151871	CCNE2	-1.902210698
8167998	AR	2.020242246	7953428	CD4	-1.640669327
7985285	ARNT2	1.594769045	8063156	CD40	1.210934292
8043244	ATO8	1.271759477	8060675	CDC25B	1.473817349
7935521	AVP11	1.679446724	7960702	CDCA3	1.502024207
7926875	BAMBI	2.103252419	7974404	CDKN3	1.086565036
8052399	BCL11A	-1.727972988	7909708	CENPF	1.324195383
7976567	BDKRB1	3.036952513	7908459	CFH	1.208603781
7976560	BDKRB2	1.653257394	8100382	CHIC2	-1.697835391
8174201	BEX1	-1.789978976	8077270	CHL1	2.199646435
7961891	BHLHE41	1.14804362	8136448	CHRM2	2.987920742

Table 1. Differentially expressed genes between idiopathic ASD patients and controls

Affy ID	Gene Symbol	Fold Change	Affy ID	Gene Symbol	Fold Change
7958202	CHST11	-1.903155356	8052355	EFEMP1	2.282526987
7966878	CIT	1.41492785	8049187	EFHD1	-1.51864236
8129937	CITED2	1.418405594	8113433	EFNA5	1.331915902
7981427	CKB	1.831951603	8176719	EIF1AY	2.507462941
8092726	CLDN1	2.449237277	8084704	EIF4A2	-1.720628743
8083887	CLDN11	2.311141001	7963575	EIF4B	1.121367044
8036252	CLIP3	1.377159129	7917182	ELTD1	-1.558270412
8083034	CLSTN2	1.437869563	7980636	EML5	2.286573833
8024111	CNN2	1.177289055	8022118	EPB41L3	1.064505578
8148029	COLEC10	1.594963527	8059279	EPHA4	1.193963522
8021946	COLEC12	1.809731926	8100578	EPHA5	2.309070077
8003171	COTL1	1.807859365	7971296	EPSTI1	1.988596896
8151993	COX6C	-1.748640976	8112045	ESM1	-5.195229535
7936835	CPXM2	1.6962225116	7923596	ETNK2	1.322582699
7997642	CRISPLD2	1.104714865	8014063	EVI2B	1.523926924
7903786	CSF1	1.80801536	8151310	EYA1	1.17796281
8095697	CXCL1	1.397659726	8147049	FABP5	-1.730096854
8176698	CYorf15A	1.013194957	8130993	FAM20C	2.186705189
8176709	CYorf15B	1.488823875	7904361	FAM46C	1.427490753
8048432	CYP27A1	1.491682476	8097288	FAT4	2.171759071
7974689	DACT1	-2.057532788	8113800	FBN2	2.189692062
7946245	DCHS1	1.674809532	8152703	FBXO32	-2.265197253
8176624	DDX3Y	3.324081297	7983630	FGF7	1.231319962
8148476	DENND3	1.283078186	7923578	FMOD	-1.808792129
7927631	DKK1	-1.907579449	7997726	FOXF1	2.015803332
7979307	DLGAP5	1.385802749	7960340	FOXM1	1.15783122
8141140	DLX5	1.766165745	8047487	FZD7	1.313035964
8037657	DMPK	1.244429585	8045835	GALNT5	1.344001835
7902512	DNAJB4	-1.720928138	7957850	GAS2L3	1.6760211
8116780	DSP	-3.227718379	7936494	GFRA1	2.941894055

Table 1. Differentially expressed genes between idiopathic ASD patients and controls

Affy ID	Gene Symbol	Fold Change	Affy ID	Gene Symbol	Fold Change
8169709	GLRX5	1.2313309	8095680	IL8	1.21736623
7965941	GLT8D2	1.815630431	8139207	INHBA	-1.753176622
8080964	GLT8D4	1.612701393	7963880	ITGA7	-1.83280467
8036710	GMFG	1.338042803	7932254	ITGA8	2.561133398
7974341	GNG2	1.426239524	8048749	KCNE4	-1.650608088
7979196	GNPNAT1	-1.718765671	8040458	KCNS3	1.183644797
8049670	GPC1	1.577852722	8177232	KDM5D	1.793676809
8126798	GPR116	-2.527143944	8099721	KIAA0746	-2.164237581
8022338	GPR125	1.307829335	7985317	KIAA1199	3.018273455
7999909	GPRC5B	2.694243038	8108301	KIF20A	2.410020398
8024194	GPX4	1.394164099	8095110	KIT	1.083865064
8081758	GRAMD1C	1.178323284	8015268	KRT34	-1.936526768
7925452	GREM2	1.944298309	8015187	KRTAP1-1	0.9510059
8121225	GRIK2	1.551345813	8019588	KRTAP1-5	1.058634235
8166202	GRPR	1.352755136	8045539	KYNU	1.459199929
7903777	GSTM5	1.185220708	7943749	LAYN	1.47329665
8046906	GULP1	1.443902904	8099524	LDB2	1.598565063
8165817	GYG2	1.260501396	8175539	LDOC1	1.536077973
8112971	HAPLN1	1.16303152	7957140	LGR5	1.963129982
8152617	HAS2	-2.039590839	8077490	LMCD1	-2.043405992
8090193	HEG1	1.30879398	8135585	LOC100128868	-1.79492524
8140556	HGF	2.507654689	8145795	LOC100293539	3.14504204
8124385	HIST1H4B	-1.667754719	8053379	LOC129293	1.312275872
8055130	HS6ST1	1.546409114	8160431	LOC554202	-2.870538133
7975076	HSPA2	1.422264115	8077499	LOH3CR2A	-3.270875684
8025601	ICAM1	1.864635453	8163257	LPAR1	1.701634441
8040103	ID2	1.227932457	8130142	LRP11	1.376444579
7937772	IGF2	2.240009881	7954810	LRRK2	1.435647794
8039484	IL11	-1.535878681	8078008	LSM3	-1.845241983
8104901	IL7R	1.432817909	8148572	LY6E	1.312769016

Table 1. Differentially expressed genes between idiopathic ASD patients and controls

Affy ID	Gene Symbol	Fold Change	Affy ID	Gene Symbol	Fold Change
8045674	LYPD6	1.333962526	7973067	NP	-1.861785796
8045664	LYPD6B	1.944312592	8019074	NPTX1	-1.994787162
8047926	MAP2	-1.546594606	7976012	NRXN3	-1.562713105
7986293	MCTP2	1.783930728	7982889	NUSAP1	1.22960804
8103695	MFAP3L	-1.850164816	8010967	NXN	1.7870679
8171297	MID1	1.55434081	7958913	OAS2	1.326480399
7937020	MKI67	1.166236802	7921882	OLFML2B	1.363953594
8055672	MIMADHC	-2.076553341	7904158	OLFML3	1.794499878
8083494	MME	1.221814671	7952785	OPCML	-2.781542677
7951271	MMP1	-2.079281326	8069252	PCBP3	1.590490307
8151684	MMP16	-2.259565885	8097449	PCDH10	-2.071045447
8041561	MORN2	1.489908187	8102792	PCDH18	1.639880651
8129573	MOXD1	1.612577886	8134869	PCOLCE	1.471366869
8110084	MSX2	1.42985588	8091243	PCOLCE2	-3.07983441
8171172	MXRA5	2.879661073	7954293	PDE3A	-2.323755776
8012475	MYH10	1.410493399	8102532	PDE5A	2.775648572
7927827	MYPN	2.152122951	8095080	PDGFRA	1.452121698
8083978	NAALADL2	1.523574852	8134339	PEG10	1.189024966
8042576	NAGK	-1.971591929	7897378	PER3	1.19542748
7953351	NCAPD2	1.221878071	7950391	PGM2L1	-1.960824539
7987642	NDUFAF1	-1.88676113	7908351	PLA2G4A	-1.608977264
8172296	NDUFB11	1.526692392	7898609	PLA2G5	1.328738252
8145361	NEFM	-2.994977095	8101429	PLAC8	1.681615767
8085867	NEK10	-1.985864585	7979710	PLEK2	-1.694850809
7984704	NEO1	1.830430011	8046680	PLEKHA3	-1.723374894
8131944	NFE2L3	2.082763211	7923635	PLEKHA6	1.542305949
7978644	NFKBIA	1.651150681	7994109	PLK1	1.876240748
8083968	NLGN1	2.044457422	8067233	PMEPA1	-2.923853483
8176655	NLGN4Y	2.417989225	8142981	PODXL	-1.714704038
7932227	NMT2	1.712716121	7971077	POSTN	-2.324185369

Table 1. Differentially expressed genes between idiopathic ASD patients and controls

Affy ID	Gene Symbol	Fold Change	Affy ID	Gene Symbol	Fold Change
7976451	PPP4R4	1.313481773	7898375	RNU1A	-1.675164194
8172531	PRAF2	1.339348357	7948894	RNU2-1	-2.131345471
7962375	PRICKLE1	1.317312289	7897801	RNU5E	-2.583820915
8135378	PRKAR2B	1.841827836	8012469	RPL26	-1.907859366
7927606	PRKG1	-1.96099045	8125835	RPS10	-1.699079577
8008784	PRR11	1.334799763	8063903	RPS21	-2.280812283
8158554	PRRX2	1.630420663	8176375	RPS4Y1	2.180871447
8037272	PSG5	1.725081401	7964733	RPSAP52	-2.008614725
8037251	PSG7	1.527478257	7920271	S100A4	1.565354285
8003953	PSMB6	1.226272562	8098195	SC4MOL	-1.712789955
7915612	PTCH2	-2.51482175	8145555	SCARA3	1.465571864
7974366	PTGER2	2.206126655	7943158	SCARNA9	-1.821994622
8066925	PTGIS	1.426794496	8171758	SCARNA9L	-2.797718752
8157650	PTGS1	-2.2172671	8131550	SCIN	1.723420161
7922976	PTGS2	-4.903203469	7914282	SDC3	1.366380634
8160346	PTPLAD2	2.221783063	8139706	SEC61G	-2.816043261
8081548	PVRL3	1.407146489	8140668	SEMA3A	2.991228076
8161238	RAB1C	1.226603597	8140686	SEMA3D	1.162500609
8021301	RAB27B	2.306246693	8113666	SEMA6A	1.171169286
8001147	RAB43	1.334893274	7990345	SEMA7A	-1.671007145
8075910	RAC2	1.215737856	7899043	SEPN1	1.315254183
7963631	RARG	1.151046342	7899615	SERINC2	1.502450015
8106660	RASGRF2	1.896457246	7981084	SERPINA9	-2.359276245
8092640	RFC4	-1.795339155	8021623	SERPINB7	1.162825081
7908376	RGS18	1.326798942	8123609	SERPINB9	1.258130053
7906919	RGS4	-2.214285348	8059376	SERPINE2	-2.598100634
7974902	RHOJ	-1.885521455	7940028	SERPING1	1.383070542
8161024	RMRP	1.247003528	8021081	SLC14A1	1.061350756
8012000	RNASEK	1.167549718	7922162	SLC19A2	-2.439910381
8075477	RNF185	1.39280412	7962559	SLC38A4	2.507295603

Table 1. Differentially expressed genes between idiopathic ASD patients and controls

Affy ID	Gene Symbol	Fold Change	Affy ID	Gene Symbol	Fold Change
7970793	SLC46A3	-2.343038088	7922404	SNORD80	-1.800800802
8094301	SLIT2	1.256023936	8026339	SNRPG	-1.857488116
7972239	SLITRK6	1.368649521	8095021	SPATA18	1.265055768
7984364	SMAD3	1.936297437	8113491	STARD4	-1.832199491
7984353	SMAD6	1.205861031	7954511	STK38L	-1.73086078
7971015	SMAD9	1.609059351	8100798	SULT1B1	-3.759539099
8107594	SNCAIP	1.958141327	8163202	SVEP1	1.266297275
8014755	SNORA21	-2.020942702	7974882	SYT16	-1.815993834
8133106	SNORA22	-1.668197942	7946221	TAF10	1.20608429
7960052	SNORA49	-1.744160142	7918284	TAF13	-2.939425399
7976810	SNORD113-3	-1.7263555	8165911	TBL1X	1.417101403
7981976	SNORD116-14	-2.746041318	7913593	TCEA3	1.21292824
7981978	SNORD116-15	-2.422101503	8063536	TFAP2C	2.164174515
7981982	SNORD116-17	-2.699356589	8141016	TFPI2	-2.879477972
7981988	SNORD116-20	-2.362206006	8093053	TFRC	-1.735456459
7981990	SNORD116-21	-2.756230519	7909789	TGFB2	1.824782311
7981953	SNORD116-3	-2.278033217	7984588	THSD4	1.550671046
7981958	SNORD116-5	-1.916309796	8122933	TIAM2	1.187326385
7981964	SNORD116-8	-2.283303687	7899627	TINAGL1	-1.473036274
8086752	SNORD13	-2.386342452	8091402	TM4SF18	1.985898027
7952339	SNORD14C	-1.993804942	8102636	TMEM155	1.273634046
8010078	SNORD1C	-2.499679102	8152976	TMEM71	1.649544001
7948910	SNORD25	-1.878761373	7962058	TMTC1	1.551054921
8005547	SNORD3A	-1.824269748	8045688	TNFAIP6	-2.564275322
8034512	SNORD41	-2.042797619	8058869	TNS1	-1.723443067
7922410	SNORD44	-1.919727816	8139500	TNS3	1.625519771
7902398	SNORD45A	-3.020401903	8150962	TOX	1.679582112
7902400	SNORD45B	-2.025346761	8012257	TP53	1.278051377
8060503	SNORD57	-2.453885551	7957221	TRHDE	1.746985881
7922408	SNORD78	-2.013603687	8131600	TSPAN13	-2.303457711

Table 1. Differentially expressed genes between idiopathic ASD patients and controls

Affy ID	Gene Symbol	Fold Change
7939559	TSPAN18	1.328157457
7918857	TSPAN2	-1.655907579
7976128	TTC8	1.173752743
8116649	TUBB2A	1.176213353
8165496	TUBB2C	2.339032743
7950307	UCP2	1.667018934
8168416	USMG5	-1.794724008
8176578	USP9Y	2.996884746
8177137	UTY	1.331777607
7997336	VAT1L	1.274167536
7903358	VCAM1	2.23678823
8119898	VEGFA	-1.669905632
7944803	VWA5A	1.4548598
8148435	WISP1	1.677315193
8135763	WNT16	1.030391666
8142471	WNT2	1.37954999
8073397	ZC3H7B	1.19764526
8173752	ZCCHC5	1.481444341
8147837	ZFPM2	2.417307866
8176384	ZFY	1.592297576
7931561	ZNF511	1.199903974
8046815	ZNF804A	1.837967455

Table 2. Summarization of data found by functional annotation analysis by IPA and DAVID tools

Relevant Biological Functions	Number of genes	p-value
Neurological Diseases	134	9.8×10^{-5} - 1.29×10^{-3} *
Nervous system development and function (IPA)	32	1.2×10^{-4} - 1.5×10^{-3} *
Cell-to-cell signaling and interaction (IPA)**	55	1.78×10^{-5} - 1.58×10^{-3} *
Cellular Assembly and Organization (IPA)	56	2.21×10^{-6} - 1.66×10^{-3} *
Neurogenesis (DAVID)	12	6.5×10^{-5}
Cell adhesion (DAVID)	21	8.1×10^{-5}
Cytoskeleton (DAVID)	19	0.038

Relevant Canonical Pathways	Number of genes	p-value
Axonal Guidance (IPA)	22	0.015
Axonal Guidance (DAVID)	9	0.014
Regulation of actin cytoskeleton	12	0.017
Cell adhesion molecules (DAVID)	12	0.0003

* The p-values for the biological functions found by IPA are given as a range since this software do not calculate a unique p-value for the function; instead, it calculates p-values for each subcategory included in a main one.

** The category "cell-to-cell signaling and interaction" are considered here as it contains genes related to cell adhesion.

Table 3. Functionally relevant canonical pathways enriched by the genes from merged networks list

Ingenuity Canonical Pathways	B-H multiple test corrected p-value	Molecules
Axonal Guidance Signaling	3.98×10^{-13}	RAC2, CDC42, EPHA4, KRAS, WNT2, PTCH2, TUBB2B, PAK1, SEMA3D, PLXNA1, EFNA5, SMO, Neuropilin, EPHA, G protein alpai, KALRN, NRP2, PAK6, TUBB2C, SEMA3A, WNT3A, Lfa-1, Tubulin, EPHA5, GNG2, NRP1, FZD7
Ephrin Receptor Signaling	1.23×10^{-7}	RAC2, GRIN2A, G protein alpai, CDC42, KALRN, PAK6, KRAS, EPHA4, PAK1, Lfa-1, EFNA5, EPHA5, GNG2, EPHA
Semaphorin Signaling in Neurons	3×10^{-6}	SEMA3A, PAK1, PAK6, PLXNA1, RHOJ, NRP1
Regulation of Actin-based Motility by Rho	5.12×10^{-6}	RAC2, PAK1, CDC42, PAK6, RHOJ, ARHGDIA, ACTA1
Actin Cytoskeleton Signaling	7.76×10^{-6}	MYH10, RAC2, F Actin, PAK1, TIAM2, Lfa-1, F2R, CDC42, PAK6, KRAS, FGF7, ACTA1
Glutamate Receptor Signaling	1×10^{-5}	Calmodulin, GRIN2A, GRIK5, GRID2, DLG4, GRIK2, GNG2
FAK Signaling	6.9×10^{-4}	PAK1, Lfa-1, PAK6, KRAS, TNS1, ACTA1
PAK Signaling	7.24×10^{-4}	PAK1, Lfa-1, CDC42, PAK6, PDGFRA, KRAS
Integrin Signaling	9.1×10^{-4}	RAC2, PAK1, Lfa-1, CDC42, PAK6, RHOJ, KRAS, ACTA1
HGF Signaling	0.001	MAP3K10, PAK1, CDC42, HGF, KRAS
PTEN Signaling	0.001	RAC2, Lfa-1, CDC42, PDGFRA, KRAS,
CREB Signaling in Neurons	0.002	GRIN2A, GRIK5, G protein alpai, GRID2,
Rac Signaling	0.01	PAK1, Lfa-1, CDC42, PAK6, KRAS

Table 4. Functionally relevant genes shared between the analysis of idiopathic patients and TRPC6 disrupted patient and their status for CREB regulation

Gene	CREB regulation	Functional annotation
RGS4	In silico	neurotransmission
PTGS2	ChIP-on-chip	neurotransmission; activation of astrocytes;
ITGA7	In silico	cell adhesion; elongation of neurites and axons
NPTX1	In silico	outgrowth of neurites, cell adhesion, synaptic transmission
MAP2	ChIP-on-chip	development and elongation of neurites; patterning of cerebral cortex; polarization of hippocampal neurons;
EPHA4	ChIP-on-chip; In silico	cell adhesion; development of neurites
CLDN11	In silico	cell adhesion; proliferation and migration of oligodendrocytes; myelination
PCDH10	ChIP-on-chip; In silico	cell adhesion; establishment and function of specific cell-cell connections in the brain
DSP	ChIP-on-chip	cell adhesion; attachment of intermediate filaments
CLDN1	In silico	cell adhesion, myelination of cells
VCAM1	no evidence	cell adhesion; myelination of cells
SEMA3A	no evidence	chemorepulsion of axons and dendrites
HGF	no evidence	growth of neurites; dendritic arborization
ACAN	no evidence	growth of neurites

CAPÍTULO 6 – DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

De acordo com as estimativas mais recentes, 6 a cada 1000 indivíduos da população possuem um quadro clínico que preenche os critérios diagnósticos dos transtornos do espectro autista. Isto representa uma parcela substancial da população e, portanto, traz sérias implicações para os sistemas de educação e de saúde pública. Não existem dúvidas de que alterações genéticas são os fatores etiológicos da imensa maioria dos casos de TEA. A identificação destas alterações tem um impacto significativo no entendimento do funcionamento do sistema nervoso central bem como é de fundamental importância para o aconselhamento genético das famílias de pacientes com TEA e para o tratamento dos mesmos.

Embora a etiologia genética destes transtornos seja bem aceita, muito ainda se debate com relação aos padrões de herança dos TEA. As evidências da literatura mostram que tanto padrões de herança monogênico quanto poligênico e multifatorial, bem como uma heterogeneidade de loci, respondem pela etiologia desses transtornos. Dessa forma, a identificação de genes associados aos TEA é extremamente difícil visto a complexidade genética destes transtornos.

Diante do exposto, selecionamos como uma primeira abordagem neste trabalho o estudo de translocações cromossômicas, buscando encontrar genes candidatos para posteriores estudos funcionais.

Nas regiões onde se encontram os pontos de quebra identificados no estudo da paciente F2297, portadora da translocação (2;X)(q11;q24), localizam-se transcritos ainda não caracterizados e genes para os quais não encontramos evidências de envolvimento no desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC). Além disso, verificamos que a paciente é também portadora de uma isodissomia materna do cromossomo 5, aumentando ainda mais a complexidade no estudo desse caso, uma vez que mutações recessivas e efeitos de imprinting em genes deste cromossomo também podem estar contribuindo para o seu fenótipo. O estudo deste caso ilustra a importância de estudos genômicos para desvendar os mecanismos causativos de um determinado fenótipo e que nem sempre é trivial identificar o principal fator causal de um dado quadro clínico.

Por outro lado, fomos bem sucedidos em nosso objetivo com o estudo do paciente F2749, portador da translocação (3,11)(p21;q22). Neste caso, identificamos o

rompimento do gene *TRPC6*, um forte candidato para TEA em vista de seu já conhecido papel na formação de dendritos e sinapses excitatórias. Uma vez que este gene ainda não havia sido relacionado ao autismo e estudos de sua função para o desenvolvimento neuronal haviam apenas sido realizados em camundongos, decidimos investir nossos esforços em uma investigação mais aprofundada do papel deste gene nos TEA.

O desenvolvimento da técnica de reprogramação celular em 2008 foi de fundamental importância para o prosseguimento de nosso trabalho. Utilizando esta abordagem, pudemos investigar as consequências da translocação cromossômica vista neste paciente em células neuronais e progenitoras neurais (NPCs) diferenciadas a partir de células-tronco do próprio paciente, constituindo portanto o modelo mais próximo disponível para se avaliar o efeito funcional desta alteração. Os resultados desta análise mostram que o rompimento do gene *TRPC6*, por si só, deve responder pelo fenótipo deste indivíduo. Ainda está em fase de conclusão, as análises com relação à arborização dendrítica dos neurônios deste paciente. Este aspecto, se alterado, tornará mais clara a ligação entre os dados de expressão (os quais mostraram a expressão diferencial de genes ligados ao citoesqueleto) e o fenótipo *in vitro*. Além disso, ainda está em andamento o estudo da diminuição da expressão do gene *VPRBP*, através do uso de shRNA, no modelo *in vitro* de neurônio. Tal experimento ajudará a responder em definitivo se o rompimento do gene *VPRBP* também pode trazer consequências para o funcionamento adequado dos neurônios deste paciente, possibilidade que julgamos ser pequena, em vista das evidências teóricas.

A análise de expressão global realizada com DPSC também foi de grande importância para reforçar o papel do *TRPC6* como fator etiológico do autismo no paciente F2749. Além disso, os achados deste primeiro estudo também foram úteis para direcionar a investigação dos dados obtidos na análise de expressão global de pacientes autistas idiopáticos. Os resultados deste último estudo sugerem fortemente que a regulação da organização do citoesqueleto encontra-se comprometida nos pacientes com ASD. Este dado é muito relevante, pois servirá como norteador de futuras investigações a serem realizados em nosso laboratório.

Dessa forma, com relação as abordagens utilizadas concluímos que:

1. O estudo de translocações cromossômicas é um bom método de triagem inicial, pois o ponto de quebra representa uma pista muito precisa da localização de um potencial gene candidato. Embora este tipo de estudo possa ser inconclusivo em alguns casos, por outro lado, a identificação de um gene

rompido sugere fortemente a sua associação com o fenótipo estudado. No entanto, a associação de outras estratégias de investigação são fundamentais para se confirmar o envolvimento de tal gene candidato na etiologia da doença estudada.

2. O uso da reprogramação celular se mostra um modelo muito promissor na investigação especialmente de doenças para as quais não se tem acesso ao tipo celular afetado, como é o caso das doenças neurológicas. Isto vem sendo demonstrado por outros trabalhos que utilizaram este modelo para estudar doenças como Síndrome de Rett, Esquizofrenia, Síndrome de Angelman e Prader-Willi, para citar alguns exemplos. Neste trabalho, utilizamos as iPSC para estudar uma alteração genética específica encontrada em um paciente autista. Entretanto, é importante ressaltar que este modelo é extremamente útil para estudar casos em que não se conhece o fator etiológico, especialmente ao se tratar de uma doença com uma grande heterogeneidade genética como o autismo. Usando neurônios derivados das iPSC será possível identificar alterações fenotípicas comuns nos pacientes e drogas que possam reverter tais alterações, contribuindo para a busca de tratamentos destes pacientes. No entanto, a técnica de reprogramação celular é extremamente trabalhosa, o que, pelo menos até o presente momento, dificulta sua utilização para estudos de larga escala. O método ainda considerado como o mais eficiente para obter as iPSC a partir de células somáticas é o uso de vetores virais carregando os genes que induzem a reprogramação celular. Isto traz implicações tanto de biossegurança, especialmente porque alguns destes genes de reprogramação são oncogenes, quanto para a própria interpretação dos dados dos experimentos: como os genes de reprogramação serão inseridos de forma aleatória no genoma da células hospedeira, é possível que esta inserção rompa um gene, levando a uma alteração fenotípica que não é inerente a alteração genética de fato responsável pela doença em estudo. A reprogramação através de componentes químicos e citocinas vem sendo buscada por diversos grupos e podem facilitar a utilização desta abordagem para o estudo de doenças genéticas.
3. Estudos de expressão gênica global são especialmente interessantes no estudo de doenças geneticamente heterogêneas, pois pode se buscar por alterações de vias e funções biológicas e não de genes em comum. Esta abordagem gera um

grande volume de dados e é necessário muita cautela na interpretação de seus resultados. Agregar os estudos de expressão a uma hipótese a priori direciona a análise dos dados, facilitando a interpretação dos resultados.

Nossos resultados apóiam a já bem estabelecida hipótese de heterogeneidade genética nos TEA e reforçam a idéia de que as diferentes alterações genéticas, sejam herdadas em um padrão poligênico ou monogênico, levam ao comprometimento de processos celulares comuns aos pacientes. Os achados deste trabalho contribuirão para o avanço do entendimento dos TEA bem como para direcionar estudos futuros.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abell, F., Krams, M., Ashburner, J., Passingham, R., Frith, C., Frith, U. et al. (1999). The neuroanatomy of autism: a voxel-based whole brain analysis of structural scans. *Neuroreport* **10**: 1647–1651.
- Alarcón M, Abrahams BS, Stone JL, Duvall JA, Perederiy JV, Bomar JM, Sebat J, Wigler M, Martin CL, Ledbetter DH, Nelson SF, Cantor RM, Geschwind DH. (2008). Linkage, association, and gene-expression analyses identify CNTNAP2 as an autism-susceptibility gene. *Am J Hum Genet.* 82(1):150-9.
- American Psychiatric Association. (1994) Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. 4th ed. Washington (DC): American Psychiatric Association.
- Arking DE, Cutler DJ, Brune CW, Teslovich TM, West K, Ikeda M, Rea A, Guy M, Lin S, Cook EH, Chakravarti A. (2008). A common genetic variant in the neurexin superfamily member CNTNAP2 increases familial risk of autism. *Am J Hum Genet.* 82(1):160-4.
- Aylward, E., Minshew, N., Honeycutt, N., Augusting, A., Barta, P, Peralson G. et al. (1999). MRI volumes of amygdala and hippocampus in non-mentally retarded autistic adolescents and adults. *Neurology* **53**, 2145–2150.
- Bailey, A. et al.(1995). Autism as a strongly genetic disorder: evidence from a British twin study. *Psychol Med* 25: 63– 77.
- Bailey, A., Luthert, P., Dean, A., Harding, B., Janota, I., Montgomery, M., Rutter, M., Lantos, P. (1998) A clinicopathological study of autism. *Brain* **121**: 889-905.
- Bauman, M., Kemper, T., (1985). Histoanatomic observations of the brain in early infantile autism. *Neurology.* **35**: 866-74.
- Bartlett, CW, Goedken, R, Vieland, VJ. (2005). Effects of updating linkage evidence across subsets of data: reanalysis of the autism genetic resource exchange data set. *Am J Hum Genet* **76**.
- Baron, C. a, Liu, S. Y., Hicks, C., and Gregg, J. P. (2006). Utilization of lymphoblastoid cell lines as a system for the molecular modeling of autism. *Journal of autism and developmental disorders* 36, 973-82.
- Brennand KJ, Simone A, Jou J, Gelboin-Burkhart C, Tran N, Sangar S, Li Y, Mu Y, Chen G, Yu D, McCarthy S, Sebat J, Gage FH. (2011). Modelling schizophrenia using human induced pluripotent stem cells. *Nature*. Epub ahead of print.
- Chamberlain, S. J., Chen, P.-fang, Ng, K. Y., Bourgois-rocha, F., Lemtiri-chlieh, F., Levine, E. S., and Lalande, M. (2010). Induced pluripotent stem cell models of the genomic imprinting disorders Angelman and Prader – Willi syndromes. *PNAS* 107, 17668-17673.

- Chess, S, Korn, SJ, Fernandez, PB. (1971). Psychiatric disorders in children with congenital Rubella. Bruner/ Mazel: New York, NY.
- Chiang, C.-H., Su, Y., Wen, Z., Yoritomo, N., Ross, C. a, Margolis, R. L., Song, H., and Ming, G.-L. (2011). Integration-free induced pluripotent stem cells derived from schizophrenia patients with a DISC1 mutation. *Molecular psychiatry* (4):358-60.
- Courchesne E. (1997). Linkage Brainstem, cerebellar and limbic neuroanatomical abnormalities in autism [review] *Curr Opin Neurobiol.* 7: 269-278.
- d'Aquino, R. et al. (2009). Human dental pulp stem cells: from biology to clinical applications. *Journal of experimental zoology. Part B, Molecular and developmental evolution* 312B, 408-15.
- Deb, S, Prasad, KB, Seth, H, Eagles, JM. (1997). A comparison of obstetric and neonatal complications between children with autistic disorder and their siblings. *J Intellect Disabil Res* **41**: 81-86.
- Dimos JT, Rodolfa KT, Niakan KK, Weisenthal LM, Mitsumoto H, Chung W, Croft GF, Saphier G, Leibel R, Goland R, Wichterle H, Henderson CE, Eggan K. (2008). Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science* 321, 1218-21.
- Durand CM, Betancur C, Boeckers TM, Bockmann J, Chaste P, Fauchereau F, Nygren G, Rastam M, Gillberg IC, Anckarsäter H, Sponheim E, Goubran-Botros H, Delorme R, Chabane N, Mouren-Simeoni MC, de Mas P, Bieth E, Rogé B, Héron D, Burglen L, Gillberg C, Leboyer M, Bourgeron T. (2007). Mutations in the gene encoding the synaptic scaffolding protein SHANK3 are associated with autism spectrum disorders. *Nat Genet.* 39(1):25-7.
- Ebert, A.D., Yu, J., Rose, F.F., Jr., Mattis, V.B., Lorson, C.L., Thomson, J.A. and Svendsen, C.N. (2009) Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. *Nature*, 457, 277-280.
- El-Fishawy, P., and State, M. W. (2010). The genetics of autism: key issues, recent findings, and clinical implications. *The Psychiatric clinics of North America* 33, 83-105.
- Fatemi SH, Halt AR, Realmuto G, Earle J, Kist D., Thuras P, Merz A. (2002). Purkinje cell size is reduced in cerebellum of patients with autism *Cell Mol Neurobiol.* **22**: 171-175.
- Folstein, S. & Rutter, M. (1977). Infantile autism: a genetic study of 21 twin pairs. *J Child Psychol Psychiatry Allied Disciplines* 18: 297– 321.
- Folstein, S. E. & Rosen-Sheidley B. (2001) Genetics of autism: complex aetiology for a heterogeneous disorder. *Nature Reviews Genet.* (2) 943-955.
- Fombonne, E. (2009). Epidemiology of pervasive developmental disorders. *Pediatric research* 65, 591-8.

- Gai X, Xie HM, Perin JC, Takahashi N, Murphy K, Wenocur AS, D'arcy M, O'Hara RJ, Goldmuntz E, Grice DE, Shaikh TH, Hakonarson H, Buxbaum JD, Elia J, White PS. (2011). Rare structural variation of synapse and neurotransmission genes in autism. *Molecular psychiatry*, Epub ahead of print.
- Gillberg, C. (1998). Asperger syndrome and high-functioning autism. [Review]. *Br. J. Psychiatry* **172**: 200-9.
- Gillberg, C, Coleman, M. (2000). *The biology of the autistic syndromes*, 3rd edn. Mac Keith Press, Distributed by Cambridge University Press: London, UK.
- Gregg JP, Lit L, Baron CA, Hertz-Picciotto I, Walker W, Davis RA, Croen LA, Ozonoff S, Hansen R, Pessah IN, Sharp FR. (2008). Gene expression changes in children with autism. *Genomics* 91, 22-9.
- Hargus G, Cooper O, Deleidi M, Levy A, Lee K, Marlow E, Yow A, Soldner F, Hockemeyer D, Hallett PJ, Osborn T, Jaenisch R, Isacson O. (2010). Differentiated Parkinson patient-derived induced pluripotent stem cells grow in the adult rodent brain and reduce motor asymmetry in Parkinsonian rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(36):15921-6.
- Hofmann, T., Obukhov, a G., Schaefer, M., Harteneck, C, Gudermann, T., and Schultz, G. (1999). Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol. *Nature* 397, 259-63.
- Hong, F., Breitling, R., McEntee, C. W., Wittner, B. S., Nemhauser, J. L., Chory, J. (2006). Rankprod: a bioconductor package for detecting differentially expressed genes in meta-analysis. *Bioinformatics*, 22(22), 2825–2827.
- Howard, M., Cowell, P., Boucher, J., Broks, P., Mayes, A., Farrant, A., Roberts, N. (2000) Convergent neuroanatomical and behavioural evidence of an amygdala hypothesis of autism. *Neuroreport* **11**, 2931-2935.
- Hu, V. W., Frank, B. C., Heine, S., Lee, N. H., and Quackenbush, J. (2006). Gene expression profiling of lymphoblastoid cell lines from monozygotic twins discordant in severity of autism reveals differential regulation of neurologically relevant genes. *BMC genomics* 7:118.
- Hu, V. W., Nguyen, Anhtu, Kim, K. S., Steinberg, M. E., Sarachana, T., Scully, M. a, Soldin, S. J., Luu, T., and Lee, N. H. (2009a). Gene expression profiling of lymphoblasts from autistic and nonaffected sib pairs: altered pathways in neuronal development and steroid biosynthesis. *PloS one* 4, e5775.
- Hu, V. W., Sarachana, T., Kim, K. S., Nguyen, Anhtu, Kulkarni, S., Steinberg, E., Luu, T., Lai, Y., and Lee, N. H. (2009b). Gene Expression Profiling Differentiates Autism Case–Controls and Phenotypic Variants of Autism Spectrum Disorders: Evidence for Circadian Rhythm Dysfunction in Severe Autism. *Autism* 2, 78-97.

- Inoue R, Okada T, Onoue H, Hara Y, Shimizu S, Naitoh S, Ito Y, Mori Y. (2001). The transient receptor potential protein homologue TRP6 is the essential component of vascular $\alpha(1)$ -adrenoceptor-activated $\text{Ca}(2+)$ -permeable cation channel. *Circ Res.* 2001 88(3):325-32.
- Irizarry, R. A., Hobbs, B., Collin, F., Beazer-Barclay, Y. D., Antonellis, K. J., Scherf, U., Speed, T. P. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostat 4* (2): 249–264, 2003.
- Jull-Dam, N, Townsend, J, Courchesne, E. (2001). Prenatal, perinatal and neonatal factors in autism, pervasive developmental disorder not-otherwise specified and the general population. *Pediatrics* **107**: E63.
- Kadar K, Kiraly M, Porcsalmy B, Molnar B, Racz GZ, Blazsek J, Kallo K, Szabo EL, Gera I, Gerber G, Varga G. (2009). Differentiation potential of stem cells from human dental origin - promise for tissue engineering. *Journal of physiology and pharmacology* 60 Suppl 7, 167-75.
- Kim HG, Kishikawa S, Higgins AW, Seong IS, Donovan DJ, Shen Y, Lally E, Weiss LA, Najm J, Kutsche K, Descartes M, Holt L, Braddock S, Troxell R, Kaplan L, Volkmar F, Klin A, Tsatsanis K, Harris DJ, Noens I, Pauls DL, Daly MJ, MacDonald ME, Morton CC, Quade BJ, Gusella JF. (2008). Disruption of neurexin 1 associated with autism spectrum disorder. *Am J Hum Genet.* 82(1):199-207.
- Kusenda, M., and Sebat, J (2008). The role of rare structural variants in the genetics of autism spectrum disorders. *Cytogenetic and genome research* 123, 36-43.
- Lee, G., Papapetrou, E.P., Kim, H., Chambers, S.M., Tomishima, M.J., Fasano, C.A., Ganat, Y.M., Menon, J., Shimizu, F., Viale, A. et al. (2009) Modelling pathogenesis and treatment of familial dysautonomia using patient-specific iPSCs. *Nature*, 461, 402-406.
- Leuner, K., Kazanski, V., Müller, M., Essin, K., Henke, B., Gollasch, M., Harteneck, Christian, and Müller, W. E. (2007). Hyperforin--a key constituent of St. John's wort specifically activates TRPC6 channels. *FASEB journal* 21, 4101-11.
- Maestrini, E., Paul, A., Monaco, A. P. & Bailey, A. (2000). Identifying autism susceptibility genes. *Neuron* **28**: 19-24.
- Marchetto, M. C. N., Carromeu, C., Acab, A., Yu, D., Yeo, G. W., Mu, Y., Chen, G., Gage, F. H., and Muotri, A. R. (2010). A Model for Neural Development and Treatment of Rett Syndrome Using Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell* 143, 527-539.
- Marshall, C. R. et al. (2008). Structural Variation of Chromosomes in Autism Spectrum Disorder. *Journal of Human Genetics*, 82(2):477-488.
- Millar JK, Wilson-Annan JC, Anderson S, Christie S, Taylor MS, Semple CA, Devon RS, St Clair DM, Muir WJ, Blackwood DH, Porteous DJ.(2000). Disruption of two novel genes by a translocation co-segregating with schizophrenia. *Hum Mol Genet.* 9(9):1415-23.

- Miller, S. A., Dykes, D. D. & Polesky, H. F. A. (1998). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 16: 1215.
- Molloy, CA, Keddache, M, Martin, LJ. (2005). Evidence for linkage on 21q and 7q in subset of autism characterized by developmental regression. *Mol Psychiatry* 10(8):741-6.
- Muhle R, Trentacoste SV, Rapin I. (2004). The genetics of autism. *Pediatrics*. 113(5):e472-86.
- Nishimura, Y. et al. (2007). Genome-wide expression profiling of lymphoblastoid cell lines distinguishes different forms of autism and reveals shared pathways. *Human molecular genetics* 16, 1682-98.
- Okada, T. et al. (1999). Molecular and functional characterization of a novel mouse transient receptor potential protein homologue TRP7. Ca(2+)-permeable cation channel that is constitutively activated and enhanced by stimulation of G protein-coupled receptor. *Journal of biological chemistry* 274, 27359-70.
- Park IH, Arora N, Huo H, Maherali N, Ahfeldt T, Shimamura A, Lensch MW, Cowan C, Hochedlinger K, Daley GQ. (2008). Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell*. 5,134(5):877-86.
- Paula, C. S., Ribeiro, S. H., Fombonne, E., and Mercadante, M. T. (2011). Brief Report: Prevalence of Pervasive Developmental Disorder in Brazil: A Pilot Study. *Journal of autism and developmental disorders*. Epub ahead of print.
- Pierce, K., Muller, R.A., Ambrose, J., Allen, G., Courchesne, E. (2001). Face processing occurs outside the fusiform face area in autism: evidence from functional MRI. *Brain* **124**: 2059-2073.
- Pinto, D. et al. (2010). Functional impact of global rare copy number variation in autism spectrum disorders. *Nature*, 466(7304):368-72.
- Raj A., Rifkin S.A., Andersen E., van Oudenaarden A. (2010). Variability in gene expression underlies incomplete penetrance. *Nature*, 463 (7283), 913-8.
- Raymond GV, Bauman ML, Kemper TL. (1996). Hippocampus in autism - a Golgi analysis. *Acta Neuropathol (Berl)* **91**:117-9, 1996.
- Reyes, J. H., O'Shea, K. S., Wys, N. L., Velkey, J. M., Prieskorn, D. M., Wesolowski, K., Miller, J. M., and Altschuler, R. (2008). Glutamatergic Neuronal Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells after Transient Expression of Neurogenin 1 and Treatment with BDNF and GDNF: In Vitro and In Vivo Studies. *Journal of Neuroscience* 28, 12622-12631.
- Ritvo, E., Freeman, B., Scheibel, A., Taihung, D., Robinson, B., Guthries, D., Ritvo, A. (1986). Lower purkinji cell counts in the cerebella of four autistic subjects *Am. J. Psychiatry* **143**: 862-868.
- Ross CA, Margolis RL, Reading SA, Pletnikov M, Coyle JT. (2006). Neurobiology of schizophrenia. *Neuron*. 52(1):139-53.

- Sbacchi, S., Acquadro, F., Calò, I., Calì, F., and Romano, V. (2010). Functional annotation of genes overlapping copy number variants in autistic patients: focus on axon pathfinding. *Current genomics* 11, 136-45.
- Sebat, Jonathan et al. (2007). Strong association of de novo copy number mutations with autism. *Science* 316, 445-9.
- Soldner F, Hockemeyer D, Beard C, Gao Q, Bell GW, Cook EG, Hargus G, Blak A, Cooper O, Mitalipova M, Isacson O, Jaenisch R. (2009). Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors. *Cell*. 136(5):964-77.
- Sparks, B., Friedman, S., Shaw, D., Aylward, E., Dager, S. et al. (2002). Brain structural abnormalities in young children with autism spectrum disorder. *Neurology* **59**: 184-192.
- Steffenburg, S. et al. (1989). A twin study of autism in Denmark, Finland, Iceland, Norway and Sweden. *J. Child Psychol. Psychiatry Allied Disciplines* 30: 405– 416.
- Sullivan PF, Fan C, Perou CM. (2006). Evaluating the comparability of gene expression in blood and brain. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 5,141(3):261-8.
- Szatmari, P. et al. (2007). Mapping autism risk loci using genetic linkage and chromosomal rearrangements. *Nature genetics* 39, 319-28.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131, 861-72.
- Tusher, V. G., Tibshirani, R., and Chu, G. (2001). Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(9), 5116-5121.
- Urbach, A., Bar-Nur, O., Daley, G. Q., and Benvenisty, N. (2010). Differential modeling of fragile X syndrome by human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. *Cell stem cell* 6, 407-11.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3(7):RESEARCH0034.
- Veenstra-VanderWeele J, Cook EH Jr. (2004). Molecular genetics of autism spectrum disorder. *Mol Psychiatry*. (9):819-32.
- Vernes SC, Newbury DF, Abrahams BS, Winchester L, Nicod J, Groszer M, Alarcón M, Oliver PL, Davies KE, Geschwind DH, Monaco AP, Fisher SE. (2008). A functional genetic link between distinct developmental language disorders. *N Engl J Med*. 27,359(22):2337-45.
- Vorstman, J. a S., Staal, W. G., Daalen, E. van, Engeland, H. van, Hochstenbach, P. F. R., and Franke, L. (2006). Identification of novel autism candidate regions through analysis of

- reported cytogenetic abnormalities associated with autism. *Molecular psychiatry* 11, 1, 18-28.
- Wernig M, Zhao JP, Pruszak J, Hedlund E, Fu D, Soldner F, Broccoli V, Constantine-Paton M, Isacson O, Jaenisch R. (2008). Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 5856-61.
- Yang J, Cai J, Zhang Y, Wang X, Li W, Xu J, Li F, Guo X, Deng K, Zhong M, Chen Y, Lai L, Pei D, Esteban MA. (2010). Induced pluripotent stem cells can be used to model the genomic imprinting disorder Prader-Willi syndrome. *The Journal of biological chemistry* 285, 40303-11.
- Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin II, Thomson JA. (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*. 318(5858):1917-20.
- Zhang X, Odom DT, Koo SH, Conkright MD, Canettieri G, Best J, Chen H, Jenner R, Herbolsheimer E, Jacobsen E, Kadam S, Ecker JR, Emerson B, Hogenesch JB, Unterman T, Young RA, Montminy M. (2005). Genome-wide analysis of cAMP-response element binding protein occupancy, phosphorylation, and target gene activation in human tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102(12):4459-64.
- Zwaigenbaum, L, Szatmari, P, Jones, MB, Bryson, SE, MacLean, JE, Mahoney, WJ, et al. (2002). Pregnancy and birth complications in autism and liability to the broader autism phenotype. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 41: 572-579.

Anexo I – CARS

VIII – CARS (*Childhood Autism Rating Scale*)

Data: ____/____/____ Registro HCPA _____ Outro registro: _____

1- Número do caso _____

Nome do Paciente: _____ DN ____/____/____

Atenção: basear a entrevista em determinada idade da criança.

I. RELACIONAMENTO INTERPESSOAL	
1 1.5	Sem evidência de dificuldade ou anormalidade na relação com as pessoas: comportamento da criança é apropriado a sua idade. Alguma timidez, nervosismo ou aborrecimento podem ser observados, mas não em grau atípico.
2 2.5	Relacionamento levemente anormal: A criança pode evitar olhar o adulto nos olhos, evitar o adulto ou ficar nervoso se a interação for forçada, ser excessivamente tímido, não ser responsivo ao adulto como seria típico ou agarrar-se aos pais mais que o normal para crianças da mesma idade.
3 3.5	Relacionamento moderadamente anormal: A criança demonstra indiferença (parece ignorar o adulto). Tentativas persistentes e vigorosas são necessárias para se conseguir a atenção da criança. O contato iniciado pela criança é mínimo.
4	Relacionamento gravemente anormal: A criança é constantemente indiferente ou inconsciente ao que o adulto está fazendo. Ela quase nunca responde ou inicia contato com o adulto. Somente a tentativa mais persistente para atrair a atenção tem algum efeito.

Obs:

II. IMITAÇÃO	
1 1.5	Imitação apropriada: A criança é capaz de imitar sons, palavras e movimentos, os quais são apropriados para o seu nível de habilidade.
2 2.5	Imitação levemente anormal: A criança imita comportamentos simples como bater palmas ou sons verbais únicos, a maior parte do tempo; ocasionalmente imita somente após estimulação ou com atraso.
3 3.5	Imitação moderadamente anormal: A criança imita somente parte do tempo e requer uma grande dose de persistência ou ajuda do adulto; freqüentemente imita somente após um tempo (com atraso).
4	Imitação gravemente anormal: A criança raramente ou nunca imita sons, palavras ou movimentos mesmo com estímulos e assistência de um adulto.

Obs:

	III. RESPOSTA EMOCIONAL
1 1.5	Resposta emocional apropriada à situação e à idade: A criança demonstra tipo e grau apropriados de resposta emocional evidenciada por mudança na expressão facial, postura e conduta.
2 2.5	Resposta emocional levemente anormal: A criança ocasionalmente apresenta um tipo ou grau inapropriados de resposta emocional. As reações nem sempre estão relacionadas a objetos ou eventos que envolvam a criança.
3 3.5	Resposta emocional moderadamente anormal: A criança demonstra sinais claros de resposta emocional inadequada (tipo ou grau). As reações podem ser inibidas ou excessivas e sem relação com a situação; pode fazer caretas, rir ou tornar-se rígido até mesmo quando não há objetos ou eventos produtores de emoção.
4	Resposta emocional gravemente anormal: As respostas são raramente apropriadas à situação. Uma vez que a criança atinja um determinado humor, é muito difícil alterá-lo. Por outro lado, a criança pode demonstrar emoções diferentes quando nada mudou.

Obs:

	IV. USO DO CORPO
1 1.5	Uso do corpo apropriado à idade: A criança move-se com mesma facilidade, agilidade e coordenação de uma criança normal na mesma idade.
2 2.5	Uso do corpo levemente anormal: Algumas peculiaridades menores podem estar presentes, tais como movimentos desajeitados, repetitivos, coordenação pobre ou raro aparecimento de mais movimentos não usuais.
3 3.5	Uso do corpo moderadamente anormal: Comportamentos que são claramente estranhos ou incomuns para uma criança nesta idade podem incluir movimentos estranhos com os dedos, postura peculiar do corpo ou das mãos, fixar-se em uma parte do corpo, auto-agressão, balanceio, agitação dos dedos ou caminhar nas pontas dos pés.
4	Uso do corpo gravemente anormal: Movimentos intensos ou freqüentes do tipo listado acima são sinais de uso corporal gravemente anormal. Estes comportamentos podem persistir apesar das tentativas de desencorajá-los ou de envolver a criança em outras atividades.

	V. USO DE OBJETOS
1 1.5	Uso e interesse apropriados por brinquedos ou outros objetos: A criança demonstra interesse normal por brinquedos e os utiliza de maneira apropriada para seu nível de habilidade.
2 2.5	Uso e interesse levemente inapropriados por brinquedos ou outros objetos: A criança pode demonstrar um interesse atípico por um brinquedo ou brincar-lo de maneira inadequadamente pueril (exemplo: bater ou chupar o brinquedo).

3 3.5	Uso e interesse moderadamente inapropriados por brinquedos e outros objetos: A criança pode demonstrar pequeno interesse em brinquedos ou outros objetos ou pode estar preocupada em usá-los de maneira estranha. Ela pode focalizar em alguma parte insignificante do brinquedo, tornar-se fascinada com a luz que reflete do mesmo, repetitivamente mover alguma parte do objeto ou brincar com um objeto exclusivamente.
4	Uso e interesse gravemente inapropriados por brinquedos e outros objetos: A criança ocupa-se com algum dos comportamentos acima com maior frequência e intensidade. É difícil distrair a criança quando ela está ocupada com estas atividades inadequadas.

Obs:

	VI. ADAPTAÇÃO A MUDANÇAS
1 1.5	Resposta apropriada a mudanças: Se a criança pode perceber ou comentar as mudanças na rotina, ela é capaz de aceitar estas mudanças sem angústia.
2 2.5	Adaptação a mudanças levemente anormal: Quando um adulto tenta mudar tarefas, a criança pode continuar na mesma atividade ou usar os mesmos materiais.
3 3.5	Adaptação a mudanças moderadamente anormal: A criança resiste ativamente a mudanças na rotina, tenta continuar sua antiga atividade e é difícil de distrair. Ela pode tornar-se infeliz e zangada quando uma rotina estabelecida é alterada.
4	Adaptação a mudanças gravemente anormal: A criança demonstra reações graves às mudanças. Se uma mudança é forçada, ela pode tornar-se extremamente zangada ou não colaborativa e responder com acessos de raiva.

Obs:

	VII. RESPOSTA VISUAL
1 1.5	Resposta visual apropriada: O comportamento visual da criança é normal e adequado para sua idade. A visão é utilizada em conjunto com outros sentidos como forma de explorar um objeto novo.
2 2.5	Resposta visual levemente anormal: A criança deve ocasionalmente ser lembrada de olhar para objetos. A criança pode estar mais interessada em olhar espelhos e iluminação, pode eventualmente ficar olhando para o vazio ou pode evitar olhar as pessoas nos olhos.
3 3.5	Resposta visual moderadamente anormal: A criança deve ser lembrada frequentemente de olhar para o que está fazendo, ela pode olhar fixamente para o vazio, evitando olhar as pessoas nos olhos, olhar objetos de um ângulo incomum ou segurar os objetos muito próximos aos olhos.

4	Resposta visual gravemente anormal: A criança constantemente evita olhar par as pessoas ou para certos objetos e pode demonstrar formas extremas de outras peculiaridades visuais descritas acima.
---	--

Obs:

	VIII. RESPOSTA AUDITIVA
1 1.5	Resposta auditiva apropriada: O comportamento auditivo da criança é normal e adequado para idade. A audição é utilizada conjuntamente com outros sentidos.
2 2.5	Resposta auditiva levemente anormal: Pode haver ausência de resposta ou reação levemente exagerada a certos sons. Respostas a sons podem estar atrasadas e os sons podem necessitar de repetição para conseguir a atenção da criança. A criança pode ser distraída por sons externos.
3 3.5	Resposta auditiva moderadamente anormal: A resposta da criança aos sons é variável. Frequentemente ignora o som nos primeiros momentos em que é feito. Pode assustar-se ou cobrir as relhas ao ouvir alguns sons diários.
4	Resposta auditiva gravemente anormal: A criança sobre reage ou subreage aos sons num grau extremamente evidente, independente do tipo do som.

Obs:

	IX. RESPOSTA AO PALADAR, OLFATO E TATO
1 1.5	Uso e respostas normais: A criança explora novos objetos de um modo apropriado à idade, geralmente sentindo ou olhando. Paladar ou olfato podem ser usados quando apropriados. Ao reagir a uma dor pequena, a criança expressa desconforto mas não reage exageradamente.
2 2.5	Uso e respostas levemente anormais: A criança pode insistir em colocar objetos na boca; pode cheirar ou provar objetos não comestíveis. Pode ignorar ou ter reação levemente exagerada à dor mínima, para a qual uma criança normal expressaria somente desconforto.
3 3.5	Uso e respostas moderadamente anormais: A criança pode estar moderadamente preocupada em tocar, cheirar ou provar objetos ou pessoas. A criança pode reagir muito ou pouco.
4	Uso e respostas gravemente anormais: A criança está preocupada em cheirar, provar e sentir objetos, mais pela sensação que pela exploração normal ou uso dos objetos. A criança pode ignorar completamente a dor ou reagir muito vigorosamente a desconfortos leves.

Obs:

	X. MEDO OU NERVOSISMO
1 1.5	Medo ou nervosismo normais: O comportamento da criança é adequado a ambas situações e à idade.
2 2.5	Medo ou nervosismo levemente anormais: A criança ocasionalmente demonstra muito ou pouco medo ou nervosismo quando comparada às reações de uma criança normal da mesma idade e em situação similar.
3 3.5	Medo ou nervosismo moderadamente anormais: A criança demonstra um pouco mais ou um pouco menos de medo do que seria típico para uma criança mais nova ou mais velha em uma situação similar.
4	Medo ou nervosismo gravemente anormais: O medo persiste mesmo após experiências repetidas com eventos ou objetos inofensivos. É extremamente difícil de acalmar ou confortar a criança. A criança pode, por outro lado, falhar em demonstrar adequado respeito por perigos que outras crianças da mesma idade evitam.

Obs:

	XI. COMUNICAÇÃO VERBAL
1 1.5	Comunicação verbal normal, idade e situação apropriados.
2 2.5	Comunicação verbal levemente anormal: A linguagem demonstra um atraso global. A maior parte do discurso tem significado; porém alguma ecolalia ou inversão de pronome podem ocorrer. Algumas palavras peculiares ou jargões podem ser usados ocasionalmente.
3 3.5	Comunicação verbal moderadamente anormal: O discurso pode estar ausente. Quando presente, a comunicação verbal pode ser uma mistura de alguma comunicação significativa e alguma linguagem peculiar, tais como jargão, ecolalia ou inversão de pronome. Peculiaridades relativas à linguagem com significado podem incluir questionamentos excessivos ou preocupações com algum tópico em particular.
4	Comunicação verbal gravemente anormal: Linguagem com significado não é utilizada. A criança pode emitir gritos infantis, sons animados ou bizarros, barulhos complexos reproduzindo linguagem, ou pode apresentar o uso bizarro e persistente de palavras reconhecíveis ou frases.

Obs:

	XII. COMUNICAÇÃO NÃO VERBAL
1 1.5	Uso normal da comunicação não verbal, idade e situação apropriadas.
2 2.5	Uso da comunicação não verbal levemente anormal: Uso imaturo da comunicação não verbal; pode somente apontar vagamente ou esticar a mão para pegar o que quer de maneira imprecisa, nas mesmas situações nas quais uma criança da mesma idade pode apontar ou gesticular mais especificamente para indicar o que quer.
3 3.5	Uso da comunicação não verbal moderadamente anormal: A criança geralmente não é capaz de expressar suas necessidades ou desejos não verbalmente e não consegue compreender a comunicação não verbal dos outros.
4	Uso da comunicação não verbal gravemente anormal: A criança utiliza somente gestos bizarros ou peculiares, sem significado aparente e não apresenta consciência do significado associado aos gestos ou expressões faciais dos outros.

Obs:

	XIII. NÍVEL DE ATIVIDADE
1 1.5	Nível de atividade normal para idade e circunstâncias. A criança não é nem mais nem menos ativa que uma criança da mesma idade em uma situação similar.
2 2.5	Nível de atividade levemente anormal: a criança pode tanto ser um pouco irrequieta quanto preguiçosa e mover-se lentamente algumas vezes. O nível de atividade da criança interfere pouco na sua performance.
3 3.5	Nível de atividade moderadamente anormal: a criança pode ser bastante ativa e difícil de conter. Ela pode ter uma energia ilimitada ou pode não dormir facilmente à noite. Por outro lado, a criança pode ser bastante letárgica e necessitar de um grande estímulo para mover-se.
4	Nível de atividade gravemente anormal: a criança exhibe extremos de atividade ou inatividade e pode até mesmo mudar de um extremo ao outro frequentemente.

Anexo II – Trabalho apresentado na “VII São Paulo Research Conferences
- Cérebro e Pensamento”

DOENÇAS PSIQUIÁTRICAS E PRÉ-MUTAÇÃO NO GENE FMR1 EM FAMÍLIAS
COM TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA.

Griesi-Oliveira, K¹, Orabona, GM¹, Moreira, AS¹, Takahashi, VN¹, A Vianna-Morgante, Vadasz,

E², Passos-Bueno, MR¹

¹, Depto de Genética e Biologia Evolutiva, IB, USP, São Paulo, SP.

²SEPIA, IP, FM, USP, São Paulo, SP

Os transtornos de espectro autista (TEA), com uma incidência de 6:1000 nascimentos, se caracterizam por um prejuízo na capacidade de comunicação, de socialização bem como por padrões estereotipados de comportamentos e interesses. Agressividade, hiperatividade, impulsividade, além de retardo mental, que são manifestações clínicas de outros transtornos psiquiátricos (TP), podem também estar presentes nos pacientes TEA. Outras doenças genéticas mendelianas, como a Síndrome de X frágil (gene FMR1), estão também associadas ao autismo. Os TEA têm etiologia genética heterogênea, porém as causas genéticas são ainda pouco conhecidas. Nas famílias de TEA há maior agregação de casos de TP e de alterações mais brandas comportamentais e cognitivas similares ao dos TEA, sugerindo que há fatores de susceptibilidade comuns a estas diferentes condições. Se isto for confirmado, estratégias com maior poder estatístico poderão ser utilizadas para a identificação de genes de predisposição ao autismo. Uma outra questão em aberto é o efeito da pré-mutação do gene FMR1 na susceptibilidade ao autismo.

Assim sendo, realizamos o presente trabalho com os seguintes objetivos: a) verificar a proporção de pré-mutação no gene FMR1 em pacientes com TEA, utilizando métodos de biologia molecular; b) caracterizar a proporção de TP e outros sinais clínicos associados ao autismo em familiares dos propósitos com TEA e de propósitos com síndromes craniofaciais (SC).

Verificamos que 3 pacientes eram portadores de pré-mutação no gene FMR1 (3/311; ~1%), que é uma frequência maior do que da população geral, sugerindo que a pré-mutação é um alelo de risco para o TEA.

A análise do histórico de ocorrência de TP, problemas de fala e sociabilização e retardo mental nas famílias restantes (N=308) e 150 famílias de portadores de SC revelou uma ocorrência significativamente maior destas alterações nas famílias com TEA comparadas às famílias com SC.

Em conclusão, os nossos resultados sugerem que há uma maior agregação de doenças psiquiátricas nas famílias de propósitos TEA e que a pré-mutação no gene FMR1 está associado à predisposição do autismo. FAPESP, CNPq

Anexo III – Protocolo para reprogramação celular (adaptado de Takahashi et al., 2007)

Visão Geral

Processo	Procedimentos	Duração
Preparação dos plasmídeos (3 dias)	Transformação de bactérias	1 tarde + Overnight
	Crescer Bactérias	1 dia + Overnight
	Extraírem plasmídeos	½ dia
	Verificar plasmídeos (chek gel e quantificação)	½ dia
Produção dos vírus	- Crescer células HEK293 até atingir 50 placas	~ 7 dias
	- Transfecção + produção de vírus	~ 3 dias
	- Extração dos vírus	1 dia
Obtenção das iPS	Infecção	½ dia
	Cultivo com meio hESC e MEFs	~ 10 dias
	Isolamento de colônias	~ 7 dias
	Isolamento de clones	~ 7 dias

Atenção: o protocolo a seguir é calculado para a reprogramação de 6 linhagens celulares feitas em duplicata!

Transformação das Bactérias e Obtenção dos Plasmídeos

1. Diálise do DNA: Se o DNA tiver sido eluído em TE e a bactéria a ser transformada for eletrocompetente, é necessária a diálise para diluir os sais presentes no tampão. Encher uma placa de petri de 10cm de diâmetro com 30ml de água MilliQ. Colocar delicadamente a membrana de diálise sobre a superfície da água; ela deve ficar boiando. Se afundar, é porque a membrana foi colocada sobre a água do lado invertido. Aplicar de 1 a 5ul do DNA. Aguardar 30min.
2. Eletroporação: Mantenha tudo no gelo. Misture 1ul do DNA dialisado com 40ul das bactérias eletrocompetentes (linhagem usada no Luis Neto: DH5a). Deixar pelo menos 1min no gelo. Secar a cubeta muito bem e colocar a mistura, batendo a cubeta para que o líquido vá todo para o fundo. Encaixar a cubeta no eletroporador, com os eletrodos nas laterais. Apertar os botões raise e lower ao mesmo tempo até o indicador mostrar 2,5. Para dar o choque, apertar os dois botões vermelhos ao mesmo tempo. Ressuspender as bactérias com 1ml de LB e deixá-las a 37°C por uma hora.
3. Plaquear as bactérias
4. No dia seguinte, pegar uma colônia e crescer em 2ml de meio LB durante o dia (Não esquecer da ampicilina!!! Concentração final da ampicilina: 75 a 100ug/ul)
5. No final do dia, transferir 200ul para 200ml de meio TB. Incubar overnight a 37°C
6. Fazer o MaxiPrep para extração dos plasmídeos (kit usado: PureLink Invitrogen – K2100-17)
7. Medir concentração do DNA obtido
8. Digestão e check gel:

Plasmídeo	SOX2	cMYC	KFL4	Oct4	CMV-GP	VSV G
Enzima (1ul)	NotI	NotI	NotI	XhoI	XhoI e HindII	EcoRI
Tampão (5ul)	Buffer 3	Buffer 3	Buffer 3	Buffer R	Buffer R	Buffer EcoRI
BSA (0.5ul)	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Não
DNA (~1ug)	~1ug	~1ug	~1ug	~1ug	~1ug	~1ug
Água (Para 50ul)	Para 50ul	Para 50ul	Para 50ul	Para 50ul	Para 50ul	Para 50ul
Fragmentos	4500/1060	4500/1420	4500/1520	4930/400/370		

Obtendo HEK-293 para produção dos vírus

1. Plaquear células congeladas em uma placa
2. Quando estiver numa confluência boa, passar as células para 1 placa: 5 placas até obter 50 placas
3. Quando as células estiverem numa confluência de 80%, fazer a transfecção com os plasmídeos:
 - **Oct-4, c-Myc, Sox2, Klf4:** 13,8ug por placa de 15cm (166ug para 12 placas)
 - **CMV:** 9,2ug por placa (440ug para 48 placas)
 - **VSVG:** 4,6ug por placa (220ug para 48 placas)

Transfecção

1. Em 5ml de DMEM acrescentar:
 - CMV-GP (9.2ug/placa e 440ug para 48 placas)
 - VSVG (4.6ug/ placa e 221ug para 48 placas)
 - um dos vetores (13.8ug/ placa e 166ug para 12 placas)
2. Filtrar (filtro 0.22um); lavar a seringa com mais 7ml de meio. No final você deve ter 12ml
3. Adicionar 1,325ml de PEI para cada preparação de 12ml. Misturar muito bem (pode usar vórtex). Deixar a temperatura ambiente por 5'

OBS: PEI é um polímero de cargas positivas. Por causa disso, o DNA se associa a este polímero, que ainda assim, fica com uma carga geral positiva. Com esta carga positiva e devido o fato deste complexo todo se sedimentar sobre a membrana celular, a célula fagocita o complexo. Por mecanismos ainda não bem estabelecidos, o complexo escapa da digestão pelo endossomo, e o DNA fica livre na célula para se integrar no genoma.
4. Aplicar cerca de 1ml da preparação em cada placa de HEK293. Aplique por toda a placa e depois mova a placa para misturar bem.
5. Após 6h, trocar o meio das placas

OBS: Usar DMEM/F12 + 10% de FBS. Porém, deve-se observar como as células estão se proliferando. O DMEM/F12 tem menos glicose que o DMEM. Assim, DMEM/F12 contribui para uma proliferação mais lenta. Pode-se diminuir a porcentagem de soro para 5% também para tentar frear a proliferação.

Obtenção dos vírus

1. Após três dias da transfecção, filtrar o meio das 12 placas feitas para cada vírus.
2. Dividir este volume em 6 tubos de ultra-centrífuga. Em cada tubo cabe aproximadamente 28ml. Lembre-se de que para o uso da ultra-centrífuga, os tubos devem ser cuidadosamente pesados, devendo ter o mais próximo possível o mesmo peso.
3. Centrifugar por 2h a 19400rpm, a 12C
4. Remover o meio e acrescentar 100ul de meio DMEM High-glicose (Não ressuspender, apenas aplicar o meio no tubo).
5. Deixar overnight para ressuspensão

Protocolo iPS

Dia 0

1. No dia da coleta dos vírus, plaquear numa placa de 6 wells as células de interesse:
 - Partir de uma garrafa de 25cm² ou de uma placa de 6cm de diâmetro, com as células confluentes; tripsinizar as células e ressuspendê-las em 3ml de meio.
 - No primeiro well colocar 1ml, no segundo 0.5ml e no terceiro, 0.3ml. Isso garante que você tenha confluências diferentes no dia seguinte para poder optar pelos wells que tiverem com a melhor confluência para infecção (isto é, as células não podem estar muito esparsas, mas também não podem estar numa confluência muito alta.)

Controle da infecção imuno:

Numa placa de 24 wells, plaquear uma das linhagens utilizadas, plaqueando em cada 6 poços 100ul, 50ul e 25ul da ressuspensão feita no passo anterior

Dia 1

2. Infectar os pocinhos que estiverem com uma confluência adequada (~50%) com 200ul de vírus:
 - Retirar o meio dos pocinhos deixando apenas um pouco para ficar uma fina camada de meio.
 - Calcular o volume de vírus e dividir por 12. Este é o volume que deverá ser aplicado em cada um dos pocinhos da placa de 6 wells. Para a placa de 24 wells, usar 40ul de vírus.
 - Mexer a placa de uma em uma hora para espalhar os vírus

3. Após 5 ou 6h da infecção, remover o meio com os vírus e substituí-lo pelo meio onde as células vinham sido crescidas.

Dia 2

4. Observar as células: caso elas não estejam “bem”, trocar o meio. Caso contrário, não fazer nada.
5. Preparar placas com mEF (para cada pocinho infectado, preparar uma placa com mEF; Colocar 10⁶ células por placa – Ichemicon Cat # PMEF-CF PMEF – P3 Strain CF-1/ 5x10⁶)
 - Ressuspender as células em 10ml de meio
 - Centrifugar

- Remover o meio e ressuspender as células em 5ml de meio (o mesmo que foi usado para crescer as células que foram infectadas)
- Plaquear 1ml do ressuspendido em cada placa

Dia 3

6. Passar as células para a placa com mEF
 - Remover as células com Tryple (colocar um certo volume para cobrir o poço e depois retirar o excesso!!), inativar com 1ml de meio e colocá-las na placa com mEF (não remover o meio da placa com mEF)

Dia 4

7. Substituir o meio por Human ES Media
 - 158ml DMEM-F12 Glutamax
 - 40ml KSR
 - 2ml NEAA
 - 400ul B-mercaptoetanol (Filtrar!)
 - 30ng/ml de FGF2 (adicionar fresco)
 - É importante que esta mudança de meio seja feita 72h após a infecção!

Dia 5 a dia 9

8. Trocar todos os dias o meio das células, usando o seguinte meio:
 - Mesmo meio acima + 10mM de VPA (1:1000 do volume de meio)
 - Preparo do VPA: um pouquinho do pó + 10ml de PBS – FILTRAR!

Dia 9

9. Preparar placas com mEF (usar meio DMEM-F12 + 10%FBS). Estas placas serão utilizadas para condicionar o meio, já que as mEFs que estão sendo utilizadas como feeder-layer nas placas com as células a serem reprogramadas já estão velhas.

Dia 10

10. Trocar meio das células e das MEFs usando meio hES (não usar mais o VPA e não usar FGF nas MEFs das placas que estão sendo utilizadas para condicionar o meio)

Dia 11

11. Utilizar o meio das MEFs para substituir o meio das células em processo de indução, acrescentando o FGF

Dia 15/16 aproximadamente

1. Preparar placa com matrigel para passar as colônias. O matrigel solidifica a temperatura ambiente. Para que ele não solidifique na pipeta, preencha a pipeta algumas vezes com meio gelado (DMEM knockout ou DEMEM F-12), transfira 25ml de meio para um tubo. Faça o mesmo processo com a pipeta para pegar o matrigel e misture-o com o meio já separado. Coloque o meio nas placas (7ml para placa de 10cm/ 3ml para placa de 6cm/ 2.5ml para placa de 6 wells) e deixe a temperatura ambiente por 10-15min. Retire tudo e coloque imediatamente meio mTSER na placa.

2. Colete manualmente as colônias e passe para a placa preparada com matrigel. Nesta etapa não tem problema coletar colônias ruins, pois elas serão negativamente selecionadas.

Dia 20/21 aproximadamente

1. Se as colônias estiverem de um tamanho razoável, transeferir cada colônia para um well numa placa de 6-wells. A placa deve ser preparada com matrigel e as células mantidas com mTeSR. No momento de transferir, evite pegar células diferenciadas.

A partir de então, as colônias demoram cerca de 4-7 dias para novamente atingirem um tamanho razoável para serem passadas. Deve se levar em conta o tamanho da colônia, se seu centro está se diferenciando, o tempo em que as colônias estão na placa para decidir pela passagem das mesmas.

Congelamento

1. Trate as células com ROCK inhibitor (5uM ou 10uM – a concentração do estoque é de 5mM) por 2h, antes do procedimento de congelamento. É interessante trocar o meio antes de adicionar o ROCK, especialmente se houver muitas células mortas.
2. Corte as colônias com uma agulha de seringa gentilmente, descarte o meio e adicione 3ml de PBS sem Ca^{2+} e Mg^{2+} . O corte das colônias pode ser feito a olho nu, simplesmente fazendo um quadriculado na placa. Não faça um quadriculado muito pequeno.
3. Incube a 37°C por 5min
4. Remova o PBS e adicione 3ml de mTeSR
5. Remova as colônias com o auxílio de um cell lifter
6. Transfira o meio com as colônias para um tubo falcon de 15ml e aguarde até as colônias decantarem no fundo do tubo. Remova o meio
7. Adicione 0,5ml de Cryostor CS10 e ressuspensa as células, batendo no tubo suavemente
8. Transfira para um criotubo e identifique-o. Coloque os criotubos no mister frosty e mantenha-o over night no freezer -80°C. No dia seguinte, transfira as células para o Nitrogênio líquido. Isto é importante, pois as iPSC são bem sensíveis.