Angela May Suzuki

“Transtornos do Espectro Autista: progredindo para melhorias
em sua farmacoterapia”

“Autism Spectrum Disorder: moving forward to improve pharmacotherapy”

Instituto de Biociências
Universidade de São Paulo
São Paulo

2013

Angela May Suzuki

“Transtornos do Espectro Autista: progredindo para melhorias
em sua farmacoterapia”

“Autism Spectrum Disorder: moving forward to improve pharmacotherapy”

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

Orientadora: Andréa Laurato Sertié

São Paulo

2013

FICHA CATALOGRÁFICA

Suzuki, Angela May

Transtornos do Espectro Autista: progredindo para
melhorias em sua farmacoterapia

Número de páginas: 104

Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências da
Universidade de São Paulo. Departamento de Genética e
Biologia Evolutiva

1. Transtornos do Espectro Autista, 2. Sinalização PI3K-mTOR,
3. Antipsicóticos.

Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências.
Departamento de Genética e Biologia Evolutiva

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Profa. Dra. Andréa Laurato Sertié
Orientador

"You see things; and you say, 'Why?'

But I dream things that never were; and I say,

'Why not?'"

—George Bernard Shaw

AGRADECIMENTOS

Este estudo é fruto do envolvimento e dedicação de muitos: a começar pelos meus pais Rosa e Ignácio, que não puderam acompanhar o meu crescimento profissional, mas nunca deixaram de acreditar no meu potencial. Obrigada pela pessoa que vocês me fizeram, e por nunca deixar me perder mesmo estando longe. Obrigada por todo o sacrifício, maior símbolo de amor que eu poderia ter. Meus sinceros agradecimentos também aos meus tios que me acolheram com o maior carinho durante esses anos de mestrado.

Meus mais profundos agradecimentos à Dra. Andréa Sertié, minha orientadora que embora nem sempre pudesse me acompanhar tão de perto nunca deixou de ser uma ótima orientadora e pesquisadora. Obrigada por me acolher, e por todos os ensinamentos. Meus profundos agradecimentos também à Camila Freitas cujo apoio técnico foi indispensável para a conclusão deste trabalho.

À Dra. Maria Rita por quem eu cultivo uma imensa admiração. Obrigada por ter me acolhido em seu laboratório e ter permitido que eu fizesse parte de um lugar que eu considero meu segundo lar. Lugar este cujos integrantes tem um potencial científico incrível e sempre me proporcionaram um ambiente repleto de conhecimento. Mas acima de tudo, me ensinaram como fazer ciência com prazer e qualidade de vida. Obrigada por serem mais do que grandes amigos, e por me proporcionar um ambiente acolhedor e reconfortante. Cada um de vocês é especialmente único para mim. Em especial gostaria de agradecer ao grupo do autismo: Karina, Danielle, Ana, Cintia e Erick que além de todo o companheirismo e amizade, me fizeram apaixonar por essa condição tão fascinante que é o autismo. Obrigada Erika Yeh. Você que não está mais conosco, mas nunca deixou de estar presente, principalmente agora que trabalha com autismo. Obrigada pelas revisões e descontrações nesta reta final. Ao meu

amiguinho Gerson, pelas caronas, almoços, reflexões e discussões, mas principalmente por me entender. Obrigada Atique, pelo apoio técnico, moral e por compartilhar as dores do Western. Ao Luciano, Carol e Joanna pelas preocupações e apoio sempre. Obrigada Bruno, pelas descontrações e incontáveis citometrias. Larissa, você que também não está mais conosco, mas não posso deixar de agradecer as conversas na cultura e também pelas citometrias. Ao Lucas, por sua alegria contagiante e generosa. E à Vanessa por sempre alegrar o ambiente. Por fim, mas não menos importante, meus sinceros agradecimentos às técnicas do laboratório Andressa e Simone. Vocês foram essenciais para a conclusão deste trabalho.

À equipe do Centro de Estudos do Genoma Humano por toda colaboração e suporte, em especial à Meire, pela amizade, ensinamentos e apoio nos momentos difíceis. Agradeço também a todos os médicos e psicólogos que diagnosticaram e encaminharam os pacientes para o Centro de Estudos do Genoma Humano; e à colaboração da equipe do Prof. Dr. Fábio Bessa Lima que teve uma participação crucial nas discussões e conclusões de parte dos experimentos.

Aos velhos e novos amigos Camila Imamura, Diego Rezende, Takao Hashiguti, Maristela Zama, Yves Bovolenta e Pedro Victor por todas as risadas e confortos em momentos de surto; e Haroldo, obrigada por me salvar de um destes momentos na reta final.

Apesar do trabalho e dedicação de muitos, este trabalho não seria possível se não fossem todas as famílias e pacientes autistas que depositaram sua confiança em nossa equipe. Que este trabalho possa contribuir para o entendimento destes transtornos e para que um dia vocês possam ter uma melhor qualidade de vida.

Finalmente, agradeço à Capes, FAPESP/CEPID e Autismo e Realidade por todo o apoio financeiro.

Esta dissertação de Mestrado compreende um trabalho inédito desenvolvido durante os anos de 2010 a 2012 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 IB-USP. Dessa maneira, são apresentados apenas os estudos que resultaram em um artigo científico publicado em 2011, e outro que será submetido para publicação em breve. Por esse motivo, optei por redigi-los em inglês. As seções referentes à introdução, metodologia e discussão geral estão escritas em português, conforme especificado pelas regras do IB-USP.

As referências bibliográficas referentes a cada um dos artigos estão relacionadas ao final dos mesmos. Já as referências bibliográficas que constam na introdução, metodologia e discussão encontram-se ao final da dissertação. A norma bibliográfica escolhida foi a estipulada pela ABNT, exceto para os capítulos referentes ao artigo já publicado e ao artigo a ser submetido.

Visto que cada artigo científico possui descrição de suas metodologias, o capítulo que se refere à metodologia geral se aterá apenas a uma breve explicação acerca de procedimentos não detalhados nos artigos.

Capítulo I.	01
Introdução Geral e Objetivos	
Capítulo II.	21
Metodologia Geral	
Capítulo III.	37
<i>Altered PI3K-mTOR signaling in non-syndromic autism spectrum disorders</i>	
Capítulo IV.	67
<i>Effects of antipsychotics with different weight gain liabilities on human in vitro models of adipose tissue differentiation and metabolism</i>	
Capítulo V.	77
Discussão Geral e Conclusões	
Resumo	81
Abstract	82
Referências Bibliográficas	84

CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO GERAL E OBJETIVOS

1.1 ASPECTOS CLÍNICOS, PATOFISIOLÓGICOS E EPIDEMIOLÓGICOS DOS TRANSTORNOS DO ESPECTRO AUTISTA (TEA)

Os Transtornos do Espectro Autista (TEA) constituem um grupo de desordens neurológicas complexas, caracterizado por prejuízo significativo do desenvolvimento comportamental. Suas manifestações clínicas abrangem três domínios principais: 1) anormalidades na capacidade de comunicação, 2) anormalidades na capacidade de interação social recíproca, e 3) padrões comportamentais e de interesse estereotipados e repetitivos; sendo que cada um destes três domínios sintomáticos pode apresentar uma grande variabilidade dentre os indivíduos com TEA (American Psychiatric Association, 1994; e revisado por Miles, 2011).

Diante da ausência de um marcador neurobiológico claro, os TEA são diagnosticados e classificados de acordo com o grau de comprometimento desses três domínios comportamentais principais seguindo os critérios do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-IV, *American Psychiatric Association*, 1994). Segundo este manual, os TEA são divididos em três categorias: a Síndrome de Asperger, que se apresenta no extremo mais leve de manifestações do espectro, e é caracterizada pela ausência de atraso na comunicação verbal e de prejuízo significativo do desenvolvimento cognitivo (Ghaziuddin & Mountain-Kimchi, 2004); o autismo típico, o qual apresenta alterações nos três domínios comportamentais, sendo pelo menos um deles evidenciado antes dos 3 anos de idade (*American Psychiatric Association*, 1994); e os transtornos invasivos do desenvolvimento sem outras especificações (*Pervasive Developmental Disorder not otherwise specified* – PDDNOS), nos quais os critérios para o diagnóstico de autismo não são satisfeitos em vista de seu início

tardio (mais de 3 anos) ou sintomatologia atípica, como a ausência de anormalidades de comunicação, ou de socialização, ou de comportamento (Levy et al., 2009).

Indivíduos com TEA frequentemente apresentam uma gama de outras manifestações clínicas, que podem incluir alterações de sensibilidade sensorial (Baranek et al., 2007; Boyd et al., 2010), déficit de atenção, hiperatividade, ansiedade (Simonoff et al., 2008; Mattila et al., 2010), complicações gastrointestinais (Buie et al., 2010; Erickson et al., 2005), maior susceptibilidade a convulsões epiléticas (Bauman, 2010), deficiência intelectual (Chakrabarti & Fombone, 2005), e comportamento auto e hetero agressivo (Parikh et al., 2008).

Observações neuroanatômicas e imagens de ressonância magnética de pacientes com TEA têm frequentemente mostrado um supercrescimento prematuro do cérebro durante os primeiros anos de vida, afetando estruturas como o cerebelo, hipocampo e amígdala, (Howard et al., 2000; Sparks et al., 2002; Courchesne et al., 2004; Schumann et al., 2004; Dementieva et al., 2005). Tal crescimento é seguido por um período de “plateau” no final da infância até se normalizar na adolescência (Redcay & Courchesne, 2005). Contudo, as alterações estruturais nestas regiões nem sempre estão presentes e, portanto, não podem ser utilizadas como um marcador biológico desses transtornos.

Ao longo das últimas décadas um crescente número de crianças tem sido diagnosticado com TEA, os quais apresentam atualmente uma prevalência estimada em aproximadamente 1% das crianças, sendo a desordem neurológica mais comum dentro das alterações neurológicas que ocorrem durante a infância (Harrington, 2010; Maenner & Durkin, 2010). Ainda, os TEA são quatro vezes mais frequentes em homens que em mulheres (Fombonne, 2009).

1.2. ASPECTOS GENÉTICOS DOS TRANSTORNOS DO ESPECTRO AUTISTA

Estudos que abordaram a taxa de concordância dos TEA entre gêmeos monozigóticos e dizigóticos, assim como estudos que compararam a taxa de recorrência em parentes de primeiro grau do probando com as taxas populacionais, e estudos de síndromes genéticas raras associadas com TEA apontam para uma importante contribuição de fatores genéticos na etiologia desses transtornos (Muhle et al., 2004; Constantino et al., 2010b; Zhao et al., 2007). Atualmente, estima-se uma herdabilidade de 80%-90% para os TEA, podendo variar um pouco entre diferentes estudos e distúrbios que os compõem (Muhle, 2004).

Grande esforço tem sido feito na tentativa de se esclarecer os fatores genéticos relacionados à etiologia dos TEA, e diversos genes e regiões cromossômicas, as quais abrangem todos os cromossomos do genoma humano, já foram associadas a esses transtornos (Vorstman et al., 2006; Xu et al., 2012). Assim, a genética dos TEA tem se mostrado bastante complexa, com pouca sobreposição entre as regiões identificadas (Bartlett et al., 2005; Molloy et al., 2005). Contudo, é importante ressaltar que existem algumas exceções a isso, como as normalidades cromossômicas (sobretudo variações de número de cópias genômicas, CNVs) nas regiões 15q11-13, 16p11.2 e 22q11.3, identificadas com maior frequência em pacientes com esses transtornos (Kusenda & Sebat, 2008). Outros exemplos constituem alterações em alguns genes específicos como as alterações no gene *RELN*, o qual codifica um constituinte da matriz extracelular essencial para a maturação dos neurônios (Persico et al., 2001, Xu et al., 2012), e as alterações nos genes que codificam moléculas de adesão neuronal e outras moléculas associadas importantes para a maturação sináptica, como neurologina 3 e 4 (*NLGN3* e *NLGN4X*), neurexina 1 (*NRXN1*), e *SHANK3* (*SH3 and multiple ankyrin repeat domains 3*), as quais são um pouco mais recorrentes em pacientes com TEA (Durand et al., 2007; Kim et al., 2008; Buxbaum, 2009).

Os estudos moleculares cada vez mais aprimorados, assim como os diferentes padrões de recorrência observados nas famílias afetadas, têm sugerido múltiplos modelos de herança dentro da população de TEA. Os diversos casos podem envolver alterações estruturais dos cromossomos, o modelo multifatorial de herança (que envolve a combinação de diversas variantes alélicas de pequeno efeito somadas ou não a fatores ambientais), modelo envolvendo apenas dois ou poucos genes (atualmente denominado de modelos "two-hit" ou "multi-hit", no qual cada mutação teria um efeito patogênico maior), ou ainda modelo monogênico de herança (El-Fishawy & State, 2010; Girirajan et al. 2010). Tal heterogeneidade torna difícil a identificação de fatores genéticos que contribuam para o fenótipo dos TEA. Desta maneira, a maior parte dos casos (~80-90%) permanece idiopática, sem uma causa genética conhecida.

Apesar da grande heterogeneidade genética observada entre os casos de TEA, é importante ressaltar que uma parcela significativa dos genes já relacionados com esses transtornos faz parte de vias moleculares/biológicas comuns. Alguns exemplos dessas vias constituem as envolvidas com a formação das sinapses e circuitos neuronais (sugeridas pela identificação de genes que codificam as proteínas de adesão sináptica e de ancoragem anteriormente mencionadas) (Jamain et al., 2003; Durand et al., 2007); e as vias envolvidas com processos celulares essenciais para funcionamento do sistema nervoso central (SNC), incluindo, por exemplo, as vias que controlam a síntese de proteínas nas sinapses, como a via de sinalização intracelular PI3K-mTOR (*phosphatidylinositol 3-kinase – mammalian target of rapamycin*) (Kelleher & Bear, 2008). Assim, estes e diversos outros dados de anotação funcional (revisados por Ebert et al., 2013) têm sugerido a desregulação de redes de sinalização dependentes de atividade neuronal que controlam o desenvolvimento, função e plasticidade sináptica como um mecanismo patofisiológico comum para o desenvolvimento dos TEA.

A via de sinalização PI3K-mTOR constitui um dos enfoques deste trabalho e suas funções celulares e evidências do seu envolvimento na patofisiologia dos TEA são descritas em maiores detalhes nos tópicos que se seguem.

1.3. VIA DE SINALIZAÇÃO PI3K-mTOR EM TEA

1.3.1. MUTAÇÕES EM GENES DA VIA PI3K-mTOR ESTÃO ASSOCIADAS COM SÍNDROMES MONOGÊNICAS QUE APRESENTAM ALTA PREVALÊNCIA DE TEA

Uma porção substancial de pacientes afetados por síndromes monogênicas como a Síndrome do Cromossomo X-frágil, Esclerose Tuberosa, Síndromes com mutação em *PTEN*, Neurofibromatose do tipo 1, e Síndrome de Rett atende aos critérios diagnósticos para os TEA (Tabela 1), refletindo um risco aumentado de desenvolvimento dos sintomas de TEA conferido pelas mutações envolvidas.

Tabela 1. Síndromes monogênicas com alta prevalência de autismo.

gene	Síndrome	Função do gene	Proporção de pacientes com a síndrome com quadro de TEA	Proporção de pacientes com TEA com mutações no gene
<i>FMR1</i>	Síndrome do X-frágil	Repressor da síntese de proteínas	15%-30%	2%-5%
<i>TSC1/2</i>	Esclerose Tuberosa	Inibidor de mTOR	25%-60%	1%-4%
<i>PTEN</i>	Síndrome de Cowden	Inibidor da via de sinalização PI3K-mTOR	NF	1%
<i>NF1</i>	Neurofibromatose do tipo 1	Ras GAP	4%	0%-4%
<i>MeCP2</i>	Síndrome de Rett	Repressor de transcrição	100%	2%
NF – dado não fornecido			Adaptado de Kelleher & Bear, 2008	

Além da sobreposição fenotípica, outra característica comum entre estas doenças é que todas são causadas por mutações de perda de função em genes codificadores de reguladores negativos da via de sinalização PI3K-mTOR, levando a alterações em sua atividade (revisado por Kelleher & Bear, 2008). Uma descrição desta via de sinalização é apresentada no Box 1. Embora somente 10-15% dos casos diagnosticados como TEA façam parte de tais síndromes monogênicas, alterações moleculares envolvidas nessas doenças podem contribuir para a identificação de vias patogênicas compartilhadas pelos TEA, e para melhor compreensão de sua patofisiologia.

A Síndrome do Cromossomo X-frágil (FXS; MIM #300624) é a forma mais comum de retardo mental herdada, apresentando uma prevalência aproximada de 1/4.000 em homens e 1/7.000 em mulheres (Turner et al., 1992; Hantash et al., 2011). A FXS é causada por expansão da repetição de uma sequência de trinucleotídeos CGG (>200 repetições) na região promotora do gene *FMR1* (*Fragile X Mental Retardation 1*) mapeado no cromossomo Xq27.3 (Feng et al., 1995; Garber et al., 2006). Tal expansão leva ao silenciamento do gene, resultando em pouca ou nenhuma expressão do produto gênico FMRP (*Fragile X Mental Retardation Protein*), um ligante específico de aproximadamente 4% dos transcritos do cérebro, inibindo sua tradução (Brown et al., 2001). Algumas das moléculas-alvo de FMRP incluem os transcritos da subunidade p110 β da quinase PI3K, e da proteína PIKE (*Phosphoinositide 3-kinase enhancer*), uma molécula ativadora de PI3K (Sharma et al., 2010). Desta forma, na ausência de FMRP, PI3K e PIKE são produzidos em maiores concentrações, levando à superativação da via PI3K-mTOR nas sinapses e à desregulação da síntese de proteínas (Gross et al., 2010; Sharma et al., 2010; Darnell et al., 2011).

BOX 1. Via de sinalização PI3K-mTOR

A via de sinalização PI3K-mTOR pode ser ativada por uma gama de moléculas sinalizadoras que se ligam a receptores tirosina-quinases ou receptores acoplados a proteínas G presentes na membrana plasmática. A ativação destes receptores leva à ativação da quinase PI3K, o que resulta na geração de fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato (PIP3), que por sua vez promove o recrutamento e a fosforilação da quinase Akt no resíduo Thr308. Ainda, foi descrito recentemente que a ativação de PI3K também leva à ativação do complexo mTOR-Rictor (complexo mTORC2), que por sua vez fosforila Akt no resíduo Ser473, levando à ativação total desta quinase. Uma vez ativada, Akt fosforila TSC2 e inativa a atividade GAP do complexo TSC1/TSC2, o que leva à ativação da GTPase Rheb, que por sua vez ativa o complexo mTOR-Raptor (complexo mTORC1). Alternativamente, mTORC1 ainda pode ser ativado pela via Ras-Erk, na qual Ras, uma proteína com atividade GTPásica, ativa a quinase MEK, que ativa ERK, que por sua vez fosforila e inativa TSC2, aumentando a atividade de mTORC1. A ativação deste complexo atua então como um gatilho primário para o início da síntese de proteínas, via fosforilação de dois reguladores fundamentais do início de tradução, a quinase S6K1, e a proteína 4E-BP1 (inibidor do fator de início de tradução eIF4E). Uma vez ativada, S6K1 fosforila e ativa proteínas envolvidas no processo de tradução, como a proteína rpS6 constituinte da subunidade ribossomal 40S, e as proteínas eIF4B e eEF2A. Já 4E-BP1 quando hipofosforilada se liga fortemente ao fator de início da tradução eIF4E impedindo a ligação dessa proteína à região 5'-CAP dos RNA mensageiros (RNAm) alvos, impedindo assim o início da tradução. Quando fosforilada por mTORC1, 4E-BP1 se dissocia de eIF4E, permitindo a montagem do complexo de início da tradução.

A Esclerose Tuberosa (TSC; MIM #191100 e #613254; prevalência ~1/10.000) é uma desordem autossômica dominante causada por mutações de perda de função nos genes *TSC1* (9q34) ou *TSC2* (16p13.3) (Kwiatkowski & Manning, 2005). Seus produtos gênicos TSC1 (hamartina) e TSC2 (tuberina) formam um complexo heterodimérico com atividade GAP (*GTPase Activating Protein*) contra a GTPase Rheb, levando à sua inativação (Inoki et al., 2003; Kwiatkowski & Manning, 2005). Rheb é uma forte ativadora do complexo mTORC1 e, desta maneira, a perda de TSC1 ou TSC2 leva à superativação deste complexo.

Síndromes causadas por mutações de perda de função no gene *PTEN* (*Phosphatase and tensin homolog*) (como a síndrome de Cowden; MIM #158350; ~1/200.000 nascimentos) também têm sido associadas com aumento de atividade da via PI3K-mTOR. O gene *PTEN* (10q23.3) codifica uma fosfatase citoplasmática fundamental para a regulação da sinalização PI3K uma vez que desfosforila e inativa o segundo mensageiro PIP3, inibindo assim a ativação da proteína quinase Akt (Maehama & Dixon, 1998; Nelen et al., 1999).

A Neurofibromatose do tipo I (MIM #162200; prevalência ~1/3.500) é causada por mutações no gene *NF1* (17q11.2) que codifica a proteína neurofibromina. NF1 é um regulador negativo da via de transdução de sinal dependente de Ras. Mutações de perda de função de NF1 levam ao aumento da atividade da via de sinalização RAS-MAPK (MEK-ERK), assim como de PI3K, os quais inativam o complexo TSC1/2 e contribuem para uma hiperatividade de mTOR (Dasgupta et al., 2005).

Por fim, a Síndrome de Rett (MIM #312750; prevalência 1/10.000-23.000 mulheres – *International Rett Syndrome Association*, 2006) é causada, na sua maior parte, por mutações de perda de função no gene *MeCP2* (Xq28) (Amir et al., 1999). MeCP2, é um regulador transcricional que atua por meio de mecanismos epigenéticos na estrutura da cromatina. Abundantemente expresso principalmente em neurônios maduros, seu padrão de expressão correlaciona-se com período de diferenciação e maturação neuronal (Nan et al., 1998; Jung et

al., 2003). Embora MeCP2 não seja um regulador direto da via de sinalização PI3K-mTOR, sua perda de função está associada a menor atividade desta via, sugerindo um papel importante desta via na desregulação da síntese de proteínas observada em modelos animais da síndrome (Ricciardi et al., 2011).

Além disso, embora ainda pouco se saiba sobre a relação entre os complexos mTORC1 e mTORC2, evidências recentes em modelos animais das síndromes monogênicas com TEA têm também sugerido o envolvimento da via mTORC2 nas alterações anatômicas e comportamentais observadas nestes animais (Huang et al., 2008; Meikle et al., 2008; Huang et al., 2009; Zhou et al., 2009; Sharma et al., 2010; Ricciardi et al., 2011; Carson et al., 2012). Em um destes estudos, camundongos nocautes condicionais que não expressam a proteína Rictor, específica do complexo mTORC2, nas células progenitoras neurais e suas derivadas (como neurônios) apresentam fenótipo semelhante ao observado em TSC (Carson et al., 2012). Uma descrição detalhada dos complexos mTORC1 e mTORC2 é apresentada no Box 2.

Box 2. Complexos mTORC1 e mTORC2.

mTOR, representada na parte superior da figura, é uma proteína quinase serina/treonina constituída de diversos domínios funcionais. Esta quinase é a subunidade catalítica de dois complexos multiproteicos (mTORC1 e mTORC2), os quais são definidos pela associação com proteínas acessórias específicas. mTORC1 é constituído por 4 componentes além de mTOR: Raptor (*Regulatory associated protein of mTOR*) - que atua como uma proteína “scaffold” do complexo para posicionar os substratos 4E-BP1 e S6K1 próximos ao domínio catalítico de mTOR; mLST8 (*mammalian lethal with Sec13 protein 8, também conhecido com GβL*) - o qual está constitutivamente acoplado ao domínio catalítico de mTOR para estimular sua atividade quinase; PRAS40 (*proline-rich AKT substrate 40 kDa*) - regulador negativo do complexo; e Deptor (*DEP-domain-containing mTOR-interacting protein*) - outro regulador negativo de mTORC1. mTORC1 é sensível à rapamicina, um antibiótico macrolídeo com potente efeito antiproliferativo. O mecanismo pelo qual a rapamicina inibe mTOR não é muito bem conhecido, no entanto sabe-se que esta molécula se liga à proteína FKBP12, formando um complexo, o qual se liga ao domínio FRB (*FKBP12-rapamycin-binding*) de mTOR, inibindo sua atividade quinase. Já mTORC2 é composto por 6 proteínas diferentes, sendo 3 delas compartilha com mTORC1: mTOR, mLST8 e Deptor, além de Rictor (*rapamycin-insensitive companion of mTOR*) - fundamental para o funcionamento deste complexo, mSIN1 (*mammalian stressed-activated protein kinase interacting protein*) - regulador positivo do complexo, e Protor-1 (*protein observed with Rictor-1*) - cuja função ainda não é muito bem conhecida. Ao contrário de mTORC1, este complexo é insensível à exposição aguda da rapamicina, mas pode ser inibida indiretamente pela exposição crônica ao inibidor.

1.3.2. MUTAÇÕES EM GENES DA VIA PI3K-mTOR EM PACIENTES PORTADORES DE TEA NÃO-SINDRÔMICOS

Além dos casos das síndromes monogênicas com alta prevalência de TEA acima descritas, alguns casos de TEA não associados a tais síndromes (aqui denominados não-sindrômicos) já foram relatados com mutações em genes relacionados à via de sinalização PI3K-mTOR. Alguns destes casos envolvem a identificação de CNVs envolvendo os genes *PI3KCB* (*phosphoinositide-3-kinase catalytic beta popypeptide*) e *PIP5K3* (*Phosphatidylinositol-3-phosphate/phosphatidilinositol 5-kinase, type III*) (Cuscó et al., 2009); e os casos de mutações nos genes *eIF4E* e *eIF4G*, os quais codificam proteínas constituintes do complexo de início de tradução, e cuja ativação é dependente da via PI3K-mTOR (Neves-Pereira et al., 2009; Gkogkas et al., 2012).

Ainda, estudo de interactoma (interação proteína-proteína, fundamentada em abordagens como o sistema de duplo híbrido de levedura, e validada em sistemas de expressão heteróloga utilizando células HEK293T) de proteínas codificadas por genes já associados aos TEA identificou uma forte interação entre diversas destas moléculas com proteínas envolvidas na via de sinalização PI3K-mTOR (Sakai et al., 2011). Um dos exemplos constitui as diversas interações proteicas compartilhadas pela proteína de ancoragem sináptica SHANK3 e a proteína TSC1, os quais compartilham interações com ao menos 18 outras proteínas associadas com o autismo, como SHANK1, HOMER, e LZTS2. Tais resultados reforçam o papel relevante da via PI3K-mTOR na patofisiologia destes transtornos.

Por fim, cabe ressaltar ainda que estudo de expressão gênica global realizados com células-tronco de polpa de dentes decíduos de pacientes com autismo idiopático e de indivíduos controles apontou o enriquecimento de genes pertencentes à via de sinalização PI3K-mTOR e de genes pertencentes à família dos fatores de início da tradução (eIFs) como

diferencialmente expressos entre pacientes e controles (Grieso-Oliveira *et al.*, 2013 - artigo submetido).

1.4. VIA DE SINALIZAÇÃO PI3K-mTOR NO DESENVOLVIMENTO E FUNCIONAMENTO NEURONAL

A via de sinalização PI3K-mTOR (Box 1) está envolvida com a regulação de diversos aspectos do desenvolvimento, maturação e funcionamento do SNC (Kumar *et al.*, 2005; Jaworski *et al.*, 2005).

Diferentes estudos, sobretudo envolvendo modelos animais, têm sugerido que a via PI3K-mTOR apresenta um papel fundamental nos processos de proliferação e manutenção do estado de pluripotência de células-tronco (ou progenitoras) neurais (NPCs), assim como no processo de diferenciação dessas células em neurônios na presença de estímulos extracelulares específicos (Otaegi *et al.*, 2006; Peltier *et al.*, 2007; Han *et al.*, 2008). Ainda, recentemente, Le Belle e colaboradores (2011) sugeriram que as NPCs são sensíveis ao estado oxidativo intracelular, e que a formação de espécies reativas de oxigênio capazes de atuar como segundo mensageiros tem um papel importante na regulação da proliferação destas células por meio da ativação da via PI3K-mTOR.

Além disso, a via PI3K-mTOR está diretamente relacionada com a morfogênese neuronal, processo fundamental para a formação dos circuitos neuronais. Esta via é particularmente importante durante o estabelecimento da polaridade neuronal, formação dos axônios (Li *et al.*, 2008), arborização dendrítica, e formação dos espinhos dendríticos (Jan & Jan, 2003; Kumar *et al.*, 2005; Brandt *et al.*, 2007; Jossin & Goffinet, 2007; Vodrazka *et al.*, 2009). Foi demonstrado que a distribuição assimétrica e acúmulo de PIP3, subsequente à ativação de PI3K, contribuem para a especificação de um neurito em axônio (Shi *et al.*, 2003; Menager *et al.*, 2004; Cosker & Eickholt, 2007). Ainda, este processo é altamente coordenado

com o processo de direcionamento axonal, no qual a via PI3K-mTOR atua no remodelamento do citoesqueleto no cone de crescimento dos axônios em resposta a sinalizadores da matriz extracelular (como as proteínas Neurotrofina, NGF – *Nerve Growth Factor*, e Semaforina 3A) (Tuchker, 2002; Zhou et al., 2004; Arevalo & Rodriguez-Tebar, 2006; Chadborn et al., 2006; Gallo, 2008). Foi demonstrado também que a via PI3K-mTOR regula o tamanho do soma (corpo do neurônio) e dos dendritos; e sua ativação coordenada com a ativação da via Ras-MAPK contribui para o aumento da complexidade dendrítica (Kumar et al., 2005). A superativação da via - devido a Ras, PI3K, ou Akt constitutivamente ativas, ou *knockdown* de PTEN através do uso de siRNA (*small interference RNA*) em neurônios do hipocampo - é suficiente para induzir crescimento e arborização dos dendritos mesmo na ausência de sinais extracelulares (Jaworski et al., 2005).

Após a fase mitótica e de diferenciação neuronal, o processo de migração dos neurônios corticais recém-formados aos seus locais definitivos é dependente de diversos fatores, dentre os quais a proteína de matriz extracelular Relina tem um papel fundamental na modificação do citoesqueleto durante o direcionamento dos neurônios à placa cortical via ativação da sinalização PI3K-mTOR (Jossin & Goffinet, 2007).

Cabe ressaltar que anormalidades morfológicas e de densidade dos espinhos dendríticos, e redução de conectividade sináptica são consistentemente observadas em amostras *postmortem* de indivíduos com TEA não-sindrômico (Herbert, 2005; Herbert et al., 2004; Noriuchi et al., 2010), e são propostos como contribuintes para a transmissão sináptica aberrante presente nos pacientes (Penzes et al., 2011). Além disso, alterações dos espinhos dendríticos também têm sido observadas em amostras de pacientes, assim como nos modelos animais com as síndromes monogênicas associadas ao autismo, como FXS, TSC, e Síndrome de Rett (Revisados por Penzes et al., 2011). Tais alterações podem ser atribuídas, pelo menos em parte, a alterações na via PI3K-mTOR.

Por fim, componentes da via PI3K-mTOR estão envolvidos com a tradução nas sinapses de mRNAs cruciais para a plasticidade sináptica de longa duração e para os processos de aprendizagem e memória (Tang et al., 2002; Dayas et al., 2012). A identificação destes mRNAs alvos tem se mostrado bastante complexa; no entanto, evidências sugerem a presença de diversos transcritos de genes já associados aos TEA próximo às sinapses. Exemplos destes constituem os transcritos que codificam as proteínas MAP2 (*microtubule-associated protein 2*), α CAMKII (*calcium/calmodulin-dependent protein kinase II*), ARG3.1/ARC (*activity-regulated cytoskeleton-associated protein*), PSD-95 (*postsynaptic density protein-95*), SHANK1-3, entre outros (Steward & Schuman, 2001; Böckers et al., 2004; Burgin et al., 1990; Garner et al., 1988; Herb et al., 1997; Kindler et al., 2004, 2009; Link et al., 1995; Lyford et al., 1995; Welch et al., 2004). Ainda, é importante ressaltar também que, além de amplamente evidenciado em modelos animais das síndromes com TEA, recentemente foi descrito aumento da via PI3K-mTOR e excesso de síntese proteica em células linfoblastóides de pacientes portadores da FXS (Sharma et al., 2010; Hoeffler et al., 2012).

1.5. TRATAMENTO FARMACOLÓGICO DOS TRANSTORNOS DO ESPECTRO AUTISTA

Diversos trabalhos utilizando modelos animais sobretudo para as síndromes monogênicas com TEA acima mencionadas têm sugerido que a utilização de drogas que inibem a via PI3K-mTOR podem propiciar melhoras significativas dos déficits de aprendizagem, memória, comportamentais, anatômicos (como anormalidades nos espinhos dentrítricos), e patofisiológicos (como aumento de síntese proteica) observados nos animais. Exemplos disso constituem o uso da rapamicina, potente inibidor de mTORC1, em camundongos nocautes para *Pten* (Zhou et al., 2009), *Tsc1* (Tsai et al., 2012), e *Tsc2* (Ehninger et al., 2008); e o uso de inibidores de PI3K, como wortmanina, em camundongos modelos para

a FXS (Krueger & Bear, 2011). É interessante ressaltar que em alguns desses modelos os tratamentos foram realizados em animais adultos, sugerindo reversão parcial do fenótipo anormal mesmo em uma fase mais tardia do desenvolvimento.

Em humanos, testes clínicos utilizando inibidores da via PI3K-mTOR foram conduzidos sobretudo para o tratamento de diferentes tipos de câncer, como os observados em pacientes com Esclerose Tuberosa por exemplo (Bissler et al., 2008; Dabora et al., 2011). Até o presente, testes clínicos utilizando inibidores dessa via direcionados para o tratamento dos sintomas cognitivos e comportamentais apresentados pelos pacientes ainda não foram publicados na literatura científica. No entanto, embora ainda não concluídos, recentemente alguns estudos clínicos começaram a ser realizados utilizando o fármaco everolimus, derivado da rapamicina e inibidor de mTORC1, em pacientes com Esclerose Tuberosa (NCT01730209, NCT01289912 - *Clinical Trials*).

A grande maioria dos tratamentos farmacológicos utilizados para os TEA, sobretudo para os casos não-sindrômicos e idiopáticos, não são direcionados para os mecanismos moleculares e celulares envolvidos na patofisiologia desses transtornos, isto porque eles são ainda grandemente desconhecidos. Ainda, as terapias disponíveis para os pacientes não tratam a doença como um todo, mas somente aliviam sintomas específicos, como irritabilidade, hiperatividade e comportamentos repetitivos e estereotipados (Huffman et al., 2011; Nazeer, 2011).

Atualmente, embora diversas drogas venham sendo utilizadas na tentativa de tratar os sintomas dos TEA, somente dois agentes farmacológicos são de fato aprovados pela FDA (*Food and Drug Administration*) americana: os antipsicóticos de segunda geração (ASG ou atípicos) risperidona e aripiprazole, frequentemente usados para o tratamento da irritabilidade e da agressividade nos pacientes. Embora não aprovados pela FDA, outros ASG

também têm sido utilizados, como olanzapina, quetiapina, ziprasidona e clozapina (este último mais utilizado para o tratamento de pacientes com esquizofrenia) (Posey et al., 2008). Apesar do uso recorrente desses ASG, pouco também se sabe a respeito dos mecanismos de ação destes medicamentos, e sua aplicação terapêutica em pacientes com TEA é insatisfatória, visto que tais abordagens são caracterizadas por diversos aspectos limitantes, como o ganho de peso e a sedação como efeitos colaterais (Stigler et al., 2004; Witwer & Lecavalier, 2005).

1.6. USO DE ANTIPSICÓTICOS DE SEGUNDA GERAÇÃO (ASG) E GANHO DE PESO EM PACIENTES PSIQUIÁTRICOS

O ganho de peso é um dos efeitos colaterais mais preocupantes dos antipsicóticos, sobretudo dos de segunda geração, podendo levar a diversos problemas médicos como diabetes, hiperlipidemia, e doenças cardiovasculares (Newcomer, 2007). Tais efeitos metabólicos adversos constituem a principal causa de abandono do tratamento, fato que evidencia a necessidade de novos medicamentos terapêuticos. Uma descrição resumida dos efeitos terapêuticos e dos efeitos adversos dos antipsicóticos mais comumente utilizados para tratamento dos TEA é apresentada na Tabela 2.

Tabela 2. Antipsicóticos de segunda geração (ASG) comumente utilizados para o tratamento dos sintomas comportamentais em TEA.

Droga	Sintomas melhorados	Efeitos colaterais notáveis	Referência
Risperidona	Agressão, hiperatividade, irritabilidade e comportamento repetitivo	Ganho de peso, sedação e hipersalivação	Research Units on Pediatric Psychopharmacology Autism
Quetiapina	Agressão, hiperatividade, falta de atenção	Ganho de peso, sedação e agitação	Findling et al., 2004
Ziprasidona	Agressão e irritabilidade	Ganho de peso (baixo), sedação	Cohen et al., 2004
Aripiprazola	Agressão e irritabilidade	Ganho de peso (baixo)	Stigler et al., 2006
Olanzapina	Melhora global dos sintomas	Ganho de peso e sedação	Hollander et al., 2006

Embora os dados disponíveis sobre ganho de peso e uso de medicamentos antipsicóticos sejam provenientes sobretudo do estudo de pacientes com esquizofrenia, trabalhos indicam que o ASG mais associado ao ganho de peso significativo em pacientes com TEA é a olanzapina, seguido por quetiapina e risperidona, os quais estão associados com índices intermediários de ganho ponderal, e por ziprasidona e aripiprazola, associados com riscos mais baixos de ganho de peso (Posey et al., 2008).

Diversas pesquisas recentes buscam explicar os mecanismos moleculares subjacentes à relação entre o uso de certos antipsicóticos e o ganho ponderal. A maior parte destes trabalhos desenvolve estudos de associação tipo caso-controle entre determinados polimorfismos em genes candidatos e o aumento de adiposidade nos pacientes tratados com esses medicamentos. Os genes candidatos escolhidos incluem genes envolvidos tanto na farmacocinética como na farmacodinâmica das drogas antipsicóticas, isto é, genes que codificam proteínas envolvidas no metabolismo e eliminação das drogas do corpo; e genes que codificam proteínas-alvo da ação das drogas no organismo respectivamente (Ellingrod *et al.*, 2002; Reynolds *et al.*, 2002; Matsui-Sakada *et al.*, 2005; Han *et al.*, 2008; Deng *et al.*, 2009; Opgen-Rhein *et al.*, 2010). Embora alguns desses estudos tenham fornecido resultados positivos de associação - como no caso de polimorfismos identificados no gene do receptor de serotonina *5-HT_{2C}* (alvo dos antipsicóticos), sugerindo que tais polimorfismos possam constituir um fator real de suscetibilidade ao ganho ponderal nos pacientes (Bondy & Spellmann, 2007) - a maior parte deles é controversa e necessita de confirmação por outros estudos.

De particular interesse para este trabalho é outro grupo ainda menor de trabalhos (que não envolve estudos de associação genética) que investiga a ação de drogas

antipsicóticas sobre a diferenciação e o metabolismo do tecido adiposo (incluindo transporte de glicose, lipogênese e lipólise) tanto *in vitro* como *in vivo*.

O acúmulo de tecido adiposo no organismo, cujo excesso define o sobrepeso e a obesidade, pode ser resultado tanto do aumento de depósitos de triglicerídeos (principal lipídio armazenado) em adipócitos maduros e consequente aumento do tamanho celular, assim como do aumento no número de adipócitos devido à proliferação e diferenciação de células precursoras indiferenciadas multipotentes, denominadas células-tronco mesenquimais, as quais estão presentes no tecido adiposo independentemente da idade (Zuk *et al.*, 2001; Spalding *et al.*, 2008).

Embora a maior parte dos trabalhos que investigam a ação de ASG sobre o tecido adiposo tenha sido conduzida em linhagens celulares ou modelos animais, esses estudos sugerem que tais fármacos podem tanto favorecer a diferenciação de células-tronco ou pré-adipócitos em adipócitos, como agir no metabolismo de adipócitos maduros em favor do acúmulo de lipídios e aumento do tamanho celular (Vestri *et al.* 2006; Hemmerich *et al.* 2006; Minet-Ringuet *et al.* 2007; Pavan *et al.*, 2009). Trabalhos que investigam a ação desses fármacos em células humanas são muito escassos e seus efeitos ainda são incertos (Hemmerich *et al.*, 2006; Pavan *et al.*, 2009).

De particular importância para o presente projeto de pesquisa é o fato de que as células-tronco mesenquimais quando estimuladas *in vitro* com certos hormônios (como dexametasona, isobutilmetilxantina, indometacina e insulina) são capazes de se diferenciar em adipócitos maduros no período de duas semanas (Zuk *et al.*, 2001). Assim, essas células constituem um material muito interessante não apenas para caracterização dos eventos moleculares envolvidos em adipogênese, como também em processos patológicos como obesidade e diabetes, assim como para estudo da ação de fármacos em todos esses processos.

1.8. OBJETIVOS

A alta prevalência dos TEA somada à pouca compreensão dos mecanismos patofisiológicos envolvidos em sua etiologia e à ausência de abordagens terapêuticas eficientes tornam esses transtornos uma importante questão de saúde pública. Além disso, o ganho de peso associado ao uso de antipsicóticos soma uma preocupação adicional a essa questão, e pouco também se conhece sobre os mecanismos que levam a esses distúrbios metabólicos.

Assim, a identificação de vias biológicas passíveis de modulação por tratamentos farmacológicos, e o melhor entendimento de mecanismos moleculares e celulares da ação de fármacos utilizados no tratamento dos TEA são fundamentais para o desenvolvimento de abordagens terapêuticas mais eficientes.

Diversos estudos têm sugerido que alterações na via de sinalização PI3K-mTOR possam ser um mecanismo patofisiológico comum entre distúrbios monogênicos associados com TEA e TEA não-sindrômico. Contudo, até o momento não foram descritos estudos funcionais que de fato evidenciam alterações nessas vias em pacientes com TEA não-sindrômico.

Levando em conta as considerações acima levantadas, esta dissertação consiste em dois trabalhos independentes que apresentam os seguintes objetivos:

Capítulo III:

Objetivo geral: investigar se pacientes com autismo não-sindrômico apresentam alterações na via de sinalização PI3K-mTOR utilizando como modelo *in vitro* células-tronco mesenquimais extraídas de polpa de dente decíduo de pacientes e indivíduos controles.

Objetivos específicos: 1) investigar/comparar o perfil de ativação da via PI3K-mTOR nas células de pacientes e controles; 2) investigar se o padrão de atividade da via PI3K-mTOR correlaciona-se com a capacidade proliferativa das células de pacientes e controles; e, por fim 3) verificar o efeito de drogas antagonistas da via PI3K-mTOR sobre a capacidade proliferativa das células de pacientes e controles.

Capítulo IV:

Objetivo geral: investigar/comparar os efeitos de antipsicóticos fortemente associados com o ganho de peso, como os ASG clozapina e olanzapina, e de antipsicóticos com baixa associação com o ganho ponderal, como o ASG ziprasidona e o antipsicótico clássico (de primeira geração) haloperidol sobre a biologia do tecido adiposo humano utilizando como modelos células-tronco mesenquimais e adipócitos maduros provenientes de tecido adiposo subcutâneo de indivíduos controles.

Objetivos específicos: 1) verificar os efeitos das drogas antipsicóticas sobre a proliferação e a diferenciação adipogênica das células-tronco mesenquimais; 2) verificar os efeitos das drogas antipsicóticas sobre metabolismo (lipogênese) de adipócitos maduros.

CAPÍTULO II – MATERIAL E MÉTODOS

2.1. PACIENTES

Os pacientes incluídos neste estudo (todos do sexo masculino) foram averiguados no Centro de Estudos do Genoma Humano (CEGH) do Instituto de Biociências da USP, onde é feito o aconselhamento genético. Todos os pacientes foram encaminhados por psiquiatras e/ou neurologistas depois de realizado o diagnóstico clínico seguindo os critérios estabelecidos pelo Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-IV) (American Psychiatric Association, 1994).

Um teste molecular (PCR – *Polymerase Chain Reaction* - do gene FMR1 seguindo o protocolo sugerido por Haddad e col., 1999) para fins diagnósticos e de exclusão da Síndrome do X-frágil foi realizado no CEGH para todos os pacientes.

2.2. EXTRAÇÃO DE DNA

A extração do DNA para a realização do teste molecular para a Síndrome do cromossomo X-frágil foi feita a partir de sangue periférico dos pacientes (coletado após o consentimento dos responsáveis) utilizando-se o robô de extração de DNA Autopure 1s (*Gentra Systems*) do CEGH.

2.3. ESTABELECIMENTO DAS CULTURAS DE CÉLULAS-TRONCO DE DENTE DECÍDUO (SHEDS)

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

Inicialmente a polpa foi isolada da coroa do dente e lavada com PBS (*phosphate buffered saline*) 0,01M pH7,4 suplementado com 4% de antibiótico para remover possíveis contaminações. Em seguida o tecido foi cortado com bisturi em fragmentos de cerca de 1-4 mm² e submetidos à digestão enzimática com uma solução de tripsina-EDTA (0,25% de tripsina - Invitrogen, 1 mM EDTA) durante 15 minutos a 37°C e 5% CO₂, e então colocados em garrafas contendo meio de crescimento: DMEM F12 (GIBCO) com 15% de soro fetal bovino (SFB, GIBCO), 1% de antibiótico (penicilina/estreptomicina, 100 unidades/mL) e aminoácidos não essenciais. Os tecidos foram mantidos em cultura até a liberação das células-tronco mesenquimais, com a troca de meio realizada regularmente uma vez por semana.

2.4. ESTABELECIMENTO DAS CULTURAS DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DERIVADAS DO TECIDO ADIPOSEO SUBCUTÂNEO (PLA –*PROCESSED LIPO ASPIRATE*)

Para a obtenção das células-tronco mesenquimais de tecido adiposo subcutâneo (PLAs) foi utilizado o protocolo sugerido por Zuk et al. (2001), o qual já havia sido testado e utilizado no laboratório. Rapidamente, 10-50 mL de tecido adiposo subcutâneo da região abdominal de mulheres normais (sem diagnóstico envolvendo anormalidades neuronais e sem sobrepeso), fornecidos pelos doutores Rogério Woisky, Luciana Leonel Pepino e Vera Lúcia Nocchi Cardim (médicos cirurgiões plásticos colaboradores deste trabalho) foram lavados com PBS, e digeridos com a enzima collagenase (0,075% - Sigma) por 30 minutos. Após este período, meio de cultura DMEM-LG (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium – low glucose, Invitrogen*) com 10% de SFB e 1% de antibiótico foi adicionado para inativação da collagenase, e a porção infranadante resultante foi então centrifugada para a obtenção do pellet de células. Aproximadamente 10⁴ células foram plaqueadas em garrafas de cultura de

25 cm², contendo meio de crescimento DMEM-LG, 10% de SFB e 1% de antibiótico, e as células então cresceram aderidas ao substrato.

2.5. CULTURAS CELULARES

Todas as culturas foram mantidas em meio de crescimento, o qual foi trocado a cada dois ou três dias, a 37°C em atmosfera umedecida com 5% de CO₂ até atingir estado semiconfluyente de cerca de 80%-90% da área de crescimento para prevenir diferenciação espontânea das células. Uma vez atingido o estado semiconfluyente as células foram então dissociadas em solução de tripsina-EDTA (0,25% de tripsina, 1 mM EDTA) e replicadas para três novas garrafas, onde foi então contado como uma passagem.

Para o congelamento, as células tripsinizadas foram ressuspendidas em meio contendo 90% de SFB e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO - *LGC*), e numa concentração aproximada de $2,0 \times 10^6$ células por mL foram acondicionadas em criotubos. A temperatura foi então reduzida gradualmente, numa taxa de 1°C por minuto até atingir a temperatura final de -80°C, na qual foram mantidas durante 24 horas. Após este período, os tubos foram transferidos e armazenados em nitrogênio líquido.

Para o descongelamento das células os tubos foram aquecidos a 37°C em banho-maria, e as células ressuspendidas numa diluição de 5:1 em meio de crescimento, centrifugadas e replaqueadas.

2.6. TRATAMENTO DAS SHEDs PARA ANÁLISE DA VIA DE SINALIZAÇÃO PI3K-MTOR E EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS

Inicialmente, todas as SHEDs foram submetidas a um período de carenciamento (meio sem SFB) durante 48 horas como uma forma de inibir a ativação da via, e de reduzir variações individuais devido à dessincronização do ciclo celular. Após este período, as células foram tratadas ou não com 20% de SFB (rico em fatores de crescimento) durante 30 minutos para a ativação da via.

Após o tratamento (com/sem SFB), as células foram lavadas com PBS e submetidas à lise celular pela adição e incubação das células com o tampão de lise Ripa Buffer (1% Igepal, 0,5% SDS, 0,5% DOC, 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA) suplementado com inibidores de proteases e fosfatases (1:100 – *Sigma Aldrich*) durante 15 minutos em gelo. Os lisados então foram homogeneizados com o auxílio de um seringa com agulha de calibre 21G, centrifugados a 14000 RPM durante 20 minutos a 4°C para sua coleta e posterior estocagem a -80°C.

2.7. IMUNOBLOT

A quantificação dos lisados proteicos foi realizada seguindo as especificações do fabricante do kit de ensaio de proteína BCA (*Bicinchoninic acid assay* – *Bio Agency*), o qual é baseado em um método de Lowry modificado.

Os lisados celulares foram separados por SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*) em condições redutoras, utilizando-se de 20-25 µg de proteínas totais, as quais foram pré-aquecidas a 98°C durante 4 minutos para a desnaturação das mesmas. Em seguida, as proteínas foram transferidas eletroforéticamente para

membranas de nitrocelulose (Amersham) a 275 mÅ durante 1 hora. As membranas foram então bloqueadas com uma solução de 5% de leite (desnatado) em TBST (137 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 0,1% Tween-20) para impedir ligações inespecíficas do anticorpo, e subsequentemente incubadas *overnight* a 4°C com os seguintes anticorpos primários: anti-phospho AKT^{Ser473} (#9271), anti-phospho mTOR^{Ser2448} (#2971), anti-phospho S6^{Ser235/236} (#4858); e os anticorpos anti-Akt (#4691), anti-mTOR (#4512) e β -actin que foram utilizados como controles normalizadores da ativação das proteínas fosforiladas (todos os anticorpos foram adquiridos da Cell Signaling Technologies). Após a incubação com os anticorpos primários, as membranas foram lavadas 4x com TBST e incubadas por 1 hora a temperatura ambiente com anticorpos secundários específicos conjugado a peroxidase HRP. As membranas foram então novamente lavadas sucessivamente por 4x com TBST, e as proteínas foram detectadas por exposição a filmes de raio X utilizando-se o substrato de quimioluminescência *ECL Plus Western Blotting Detection Reagent* (Amersham).

Os níveis de expressão de cada proteína foram analisados por densitometria das bandas obtidas utilizando o software ImageJ (NIH) segundo o protocolo disponível no site do desenvolvedor (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

2.8. ENSAIO DE IMUNO-ABSORÇÃO LIGADO À ENZIMA (ELISA)

Os níveis proteicos de p-rpS6 (Ser235/236) e rpS6-total foram determinados utilizando-se os kits *PathScan® Phospho-S6 Ribosomal Protein (Ser235/236)* e *PathScan® Total-S6 Ribosomal Protein Sandwich ELISA Kit* (Cell Signaling Technology). 10 µg dos lisados proteicos totais foram incubados nas placas contendo os anticorpos específicos e analisados de acordo com as recomendações do fabricante. As reações colorimétricas foram quantificadas utilizando um leitor de ELISA automatizado.

2.9. ENSAIOS DE PROLIFERAÇÃO CELULAR

Para a confecção das curvas de crescimento, as células foram tripsinizadas, contadas no contador de células automatizado (*Countess – Invitrogen*), e plaqueadas com meio de crescimento numa densidade de 2×10^4 células por poço (de uma placa de 12 poços). Após 24 horas para total adesão das células, o meio foi substituído por meio de carenciamento (sem SFB), com o intuito de sincronizar o ciclo celular das células, cessando as divisões celulares no mesmo estágio do ciclo. Após 48 horas de carenciamento (tempo necessário para que o número de células não aumentasse, como determinado por um teste prévio), o meio de carenciamento foi substituído por meio contendo 0,5%, 5%, 10% ou 20% de SFB, o qual foi designado tempo 0 dando início à contagem. Após 0, 48, 72, 96, 120, e 144h de tratamento as células foram tripsinizadas e contadas com o auxílio citômetro de fluxo *Guava EasyCyte Flow Cytometer* (*Guava Technologies*) utilizando o software *Guava ExpressPlus 2.0* (*Guava Technologies*). Todos os experimentos foram feitos em triplicata.

Para a determinação da taxa proliferativa na presença dos inibidores rapamicina e wortmanina, o mesmo procedimento foi realizado, exceto que o meio de carenciamento foi substituído por meio contendo os inibidores rapamicina (100 nM) somado ou não a wortmanina (100 μ M) em 20% de SFB. Células tratadas com DMSO (veículo utilizado para dissolver os inibidores) foram utilizados como controles normalizadores da taxa proliferativa das células. As células foram tripsinizadas e contadas após 0, 48, 96, e 144h de tratamento.

2.10. ANÁLISE DE VARIAÇÕES DO NÚMERO DE CÓPIAS (CNVs) DOS PACIENTES

A análise da presença de CNVs dos pacientes foi realizada em colaboração com o grupo de autismo coordenado pela Profa. Dra. Maria Rita Pasos Bueno, utilizando os métodos de MLPA (*Multiplex Ligation-Dependent Probe Application – SALSA P343, MRC-Holland*) ou aCGH

(Microarray-based comparative genomic hybridization – GeneChip Mapping 500K Array, Affymetrix) de acordo com as especificações do fabricante.

2.11. IMUNOFENÓTIPO DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS OBTIDAS A PARTIR DO TECIDO ADIPOSEO SUBCUTÂNEO (ADSCs)

No intuito de verificar a homogeneidade das amostras de células-tronco mesenquimais obtidas e expandidas em cultura, as células derivadas do tecido adiposo foram caracterizadas quanto ao imunofenótipo por citometria de fluxo (*GuavaSystem*), com o uso de anticorpos monoclonais fluorescentes anti-humanos específicos para os seguintes antígenos de superfície celular: CD29, CD73, CD90 e CD105 (marcadores de células-tronco mesenquimais), CD45 (marcador de células da linhagem hematopoiética) e CD31 (marcador de células da linhagem endotelial); sendo que CD29 é conjugado à cianina (PE-Cy5), cuja emitância ocorre na faixa de comprimento de onda do vermelho; CD45 é conjugado à fluorescina (FITC), com emitância ocorre na faixa do verde; e CD31, CD73 e CD90 são conjugados à ficoeritrina (PE), cuja emitância ocorre na faixa do amarelo, todos da *Becton Dickison (BD)*. Para o antígeno CD105, que não se apresenta conjugado a moléculas fluorescentes, foi utilizado um anticorpo secundário conjugado ao fluoróforo ficoeritrina (PE).

Para cada marcador foram utilizadas aproximadamente $4,0 \times 10^5$ células. A porcentagem de célula foi calculada a partir da aquisição de 5.000 eventos celulares, e para a delimitação das células positivamente marcadas, foram utilizados controles não marcados para os três comprimentos de onda dos anticorpos primários e secundário fluorescente: vermelho, verde e amarelo. Todos os gráficos gerados foram analisados pelo *software Guava ExpressPlus (Guava Technologies)*.

2.12. DIFERENCIAÇÃO ADIPOGÊNICA DAS ADSCs

Para a indução da diferenciação adipogênica, células-tronco mesenquimais dos indivíduos controle foram plaqueadas em placas de 12 poços, e cultivadas em meio de crescimento até atingir confluência total. Neste estágio (definido como tempo zero, ou dia 0), deu-se início o protocolo de diferenciação adipogênica, pela substituição do meio de crescimento pelo meio de indução adipogênica composto por DMEM-HG (*high glucose*, *Invitrogen*) suplementado com 10% de SFB, 1% de antibiótico, 1 μ M de dexametasona (*Sigma* – ativa o fator de transcrição C/EBP β), 200 μ M de indometacina (*Sigma* – ligante de PPAR γ), 500 μ M de isobutimetilxantina (IBMX – *Sigma* – aumenta níveis intracelulares de AMPc), e 10 μ g/mL de insulina (*Sigma* – ativa PI3-kinase e Akt), de acordo com protocolo descrito por Zuk *et al.*, 2001, sendo o meio trocado a cada três dias e mantidas até o 14º dia de diferenciação, período necessário para que as células adquiram fenótipo totalmente diferenciado.

2.13. TRATAMENTO COM ANTIPSICÓTICOS

A influência dos antipsicóticos haloperidol, clozapina (ambos da Sigma), olanzapina e ziprasidona (ambos da Toronto Research Chemicals) sobre o controle do processo adipogênico foi testada pela sua adição ao meio de diferenciação em triplicatas, em diferentes concentrações (incluindo 20, 30, 40 e 100 μ M). Estas condições foram expostas às células-tronco derivadas do tecido adiposo durante a) os 3 primeiros dias do processo de diferenciação; e b) durante os 7 primeiros dias do processo adipogênico e 7 dias adicionais somente com o meio de indução, totalizando 14 dias de diferenciação no intuito de investigar se a maior exposição aos psicofármacos implicaria em maior potencial adipogênico das células-tronco mesenquimais. Em cada tempo (dia 0, 3 e 14 do processo adipogênico) as

células foram tripsinizadas e utilizadas para experimentos posteriores. Células controle foram tratadas somente com DMSO (veículo utilizado para dissolver as drogas).

As concentrações utilizadas de cada psicofármaco foram baseadas em um experimento previamente realizado no intuito de averiguar se há ação citotóxica sobre as células-tronco mesenquimais durante o processo adipogênico. Concentrações aproximadamente 10 vezes as concentrações plasmáticas encontradas em pacientes sob tratamento com estes medicamentos também foram testadas (haloperidol 0.5 μ M, olanzapina 2 μ M e clozapina 10 μ M).

2.14. ANÁLISE DE EXPRESSÃO POR PCR QUANTITATIVO EM TEMPO-REAL

A expressão de fatores de transcrição cruciais para o processo adipogênico (*C/EBP β* e *PPAR γ 2*) foi analisada a partir de níveis de mRNAs.

Os RNAs totais das células em cultura foram extraídos antes (dia 0), no dia 3 e ao término (dia 14) do protocolo de indução da diferenciação adipogênica seguindo as especificações do protocolo do *kit NuCleoSpin RNA II (Macherey-Nagel)*. Sua integridade e qualidade foram verificadas por eletroforese em gel de agarose desnaturante 1%; e com o auxílio do aparelho NanoDrop ND-1000 (espectrofotômetro da *Peqlab Biotechnologie*), foram verificadas as razões das absorbâncias 260/280 nm e 260/230 nm próximas a 2.0, e a concentração dos RNAs. Em seguida, tais RNAs serviram como molde para a obtenção dos cDNAs das diferentes amostras de acordo com o protocolo da enzima transcriptase reversa *SuperScript II (Invitrogen)*, e a utilização de *Randon primers* e 1.5 μ g de RNA total previamente purificado.

A análise da expressão gênica por PCRq-RT foi feita no sistema de detecção *Applied Biosystems 7500* (ABI, Foster City, CA, EUA) de acordo com o protocolo do fabricante do *SYBR-Green Master Mix*. O SYBR Green é uma molécula intercalante que, emite uma fluorescência quando se liga a nucleotídeos de fita dupla. Assim, quando adicionado à PCR, com o passar dos ciclos da reação à medida que novas moléculas são sintetizadas, sua fluorescência aumenta. O aparelho *ABI Prism 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems)* detecta a fluorescência crescente: quanto mais tardio o ciclo em que a fluorescência é detectada, menor a expressão do gene. O valor quantitativo de expressão, denominado C_T (*Cycle Threshold*) é obtido durante a reação e corresponde ao valor máximo da taxa de amplificação. Esse parâmetro é analisado pelo programa do aparelho.

Os pares de *primers* desenhados para a padronização da amplificação dos transcritos de interesse foram extraídos a partir de seqüências sugeridas na literatura ou com a utilização do programa *Primer Express (Applied Biosystems)* e suas relações seguem na tabela 3. Importante ressaltar que, quando possível, os *primers* foram desenhados para amplificar regiões de junções de éxons para evitar a amplificação de DNA genômico.

Genes	Primer F (5'-3')	Primer R (5'-3')
<i>C/EBPα</i>	AAGAACAGCAACGAGTACCGG	CATTGTCACTGGTCAGCTCCA
<i>PPARγ2</i>	GGGGGTGATGTGTTTGAAC	GCGATCTTGACAGGAAAGACA
<i>LPL</i>	CTGGCATTGCAGGAAGTCTG	GCATCATCAGGAGAAAGACGA
<i>HPRT1</i>	TGACACTGGCAAAACAATGC	GGTCCTTTTCACCCAGCAAGC
<i>HMBS</i>	GGCAATGCGGCTGCAA	GGTACCCACGCGAATCAC
<i>SDHA</i>	TGGGAACAAGAGGGCATCTG	CCACCACTGCATCAAATTCA
<i>GAPDH</i>	TGCACCACCAACTGCTTAGC	GGCATGGACTGTGGTCATGA

Tabela 3. Sequência de *primers* dos genes alvos e genes normalizadores utilizados nos experimentos de PCR em Tempo Real para análise de expressão gênica

Quanto à ciclagem, foi utilizado o padrão recomendado: 50°C por 2 minutos, 95 °C por 10 minutos, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Após a amplificação, as amostras foram submetidas a um ciclo de dissociação para verificar a formação de dímeros de *primers* ou a amplificação de produtos inespecíficos, o que interfere na quantificação real do transcrito alvo. Nesta reação a temperatura se eleva gradualmente de 60°C para 95°C a 0.2°C por segundo, durante 20 minutos.

As concentrações dos *primers* foram padronizadas considerando-se a utilização das menores concentrações a fim de evitar formação de dímeros de *primers* e obtenção dos menores valores de C_T possíveis. Nenhum dos *primers* testados apresentou a formação de dímeros, nem tampouco a amplificação de produtos inespecíficos.

Em seguida, para avaliar a eficiência de amplificação de cada *primer* e se existe uma amplificação proporcional à quantidade inicial do transcrito na amostra, cada transcrito foi quantificado utilizando-se quantidades iniciais conhecidas de cDNA (30, 15, 1.5 e 0.3 ng). Dessa forma, foi construído um gráfico com os C_Ts em função da quantidade logarítmica das amostras, o qual resultou em curvas-padrão lineares para todos os transcritos. O coeficiente da reta foi utilizado para calcular o valor de eficiência de cada par de *primers*, segundo a fórmula: $E = 10^{-1/\text{coeficiente da reta}}$. Se a eficiência for igual a 2, então há uma amplificação de 100% da quantidade inicial de cDNA a cada ciclo do PCR, mas valores entre 1.8 e 2.3 indicam uma boa eficiência do *primer* em questão. Todas as curvas mostraram amplificação proporcional dos transcritos.

As quantificações dos transcritos alvos não podem ser utilizadas para as análises estatísticas em seu valor absoluto, devendo ser este valor comparado à quantificação de genes envolvidos em funções básicas necessárias para a manutenção da célula, os chamados *housekeeping genes*. Assim, os transcritos dos genes *HPRT1* (gene da hipoxantina-guanina-

fosforribosiltransferase), *SDHA* (gene do complexo succinato-desidrogenase subunidade A), *HMBS* (gene da hidroximetilbilano sintase) e *GAPDH* (gene da gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase) foram então utilizados como os controles endógenos normalizadores das reações; e a expressão dos seguintes genes alvo *C/EBPα*, *PPARγ2*, e *LPL* foi determinada e analisada (para os dias 3 e 14 do processo de diferenciação adipogênica) pelo método de quantificação relativa em relação aos genes normalizadores.

O programa *geNorm* v. 3.4 (www.medgen.ugent.be/genorm/), ferramenta desenvolvida para análise de dados de PCR em Tempo Real no *Microsoft Excel*, foi utilizado para determinar os genes normalizadores mais estáveis no conjunto de amostras de cDNA, e para calcular um fator de normalização (FN) da expressão gênica para cada uma das amostras utilizando os fatores de quantificação dos quatro endógenos. Os princípios das análises e cálculos feitos pelo programa *geNorm* estão descritos em Vandesompele e colaboradores (2002). Além disso, foi utilizada uma amostra referência, sintetizada a partir de cDNAs oriundos de um *pool* de RNAs de 3 indivíduos controle, extraídos nos dias 0 e 14 do processo de diferenciação adipogênica normal, sem adição de DMSO ou das drogas antipsicóticas para os cálculos de expressão relativa.

Os valores de quantificação normalizados de cada amostra foram obtidos da seguinte maneira (modelo proposto por Pfaffl, 2001):

- **Cálculo do ΔC_T** : este valor é obtido subtraindo-se o valor de C_T obtido para a amostra do valor do C_T de uma amostra referência;

- **Cálculo do Q ou $\Delta\Delta C_T$** : é o valor resultante da eficiência de cada par de *primers* que amplifica o transcrito em questão, elevado ao valor do ΔC_T da amostra;

- **Valor de expressão normalizado final (Q/FN):** obtido através da divisão do valor de Q pelo valor do fator de normalização gerado pelo programa *geNorm*.

Para verificar a existência de uma diferença significativa nos níveis de expressão dos genes alvos entre os dias 3 e 14 do processo de diferenciação adipogênica, assim como entre o tratamento com DMSO e com os ASG clozapina e olanzapina em diferentes concentrações, foi aplicado o *teste t* bilateral pareado com correção de Welch (programa *GraphPad*); pelo qual valores de $p < 0.05$ são considerados significativos.

2.15. COLORAÇÃO COM OIL RED E ESPECTROFOTOMETRIA PARA QUANTIFICAÇÃO DO CONTEÚDO LIPÍDICO

Oil Red O é um corante vermelho específico para lipídios que pode ser utilizado para quantificar o acúmulo de triacilglicerídeos nas células. Assim, ele foi utilizado neste trabalho para quantificar adipogênese. Como o acúmulo de gotículas de lipídios ocorre somente em tempos tardios do processo de diferenciação adipogênica, a quantificação com marcação por coloração com Oil Red O foi realizada somente para as amostras que seguiram com o processo de diferenciação até o 14º dia.

Rapidamente, as células foram plaqueadas em triplicatas para cada tratamento em placas de 12 poços; e uma vez atingido o estado de confluência as células foram submetidas ao processo de diferenciação adipogênica com ou sem as drogas em diferentes concentrações durante 7 dias, e 7 dias adicionais somente com meio adipogênico (sem drogas). Ao final deste período, as células foram lavadas com PBS, fixadas em paraformaldeído (*Sigma*) 4% durante 30 minutos, e coradas com solução de Oil Red O (*Sigma*) 0.6% (60% isopropanol, 40% água) durante um período de 1h à temperatura ambiente. As células foram então lavadas 3x com 60% de isopropanol para remover o excesso de corante não incorporado, e fotografadas em

diversos campos da placa de cultura. Em seguida, o corante incorporado nas células foi removido com uma solução de 4% Nonidet P-40 (*Sigma*) em isopropanol para posterior quantificação por espectrofotometria a 490 nm. Células-tronco mesenquimais (não diferenciadas) coradas com Oil Red O foram utilizadas como controle do experimento.

2.16. QUANTIFICAÇÃO DO CONTEÚDO LIPÍDICO PELO MÉTODO ENZIMÁTICO

Alternativamente, o conteúdo lipídico das células foi quantificado utilizando-se um teste comercial fornecido pela *Laborlab*, por meio do qual as células após submetidas ao protocolo de diferenciação adipogênica durante período de 14 dias foram coletadas, centrifugadas, ressuspensas em PBS e sonificadas para homogeneizar a suspensão celular, que é então incubada juntamente com lipases que quebram as moléculas lipídicas e permitem a quantificação dos níveis totais de triglicerídeos por espectrofotometria a 505 nm.

2.17. ANÁLISE DE PROLIFERAÇÃO CELULAR SOB TRATAMENTO COM ANTIPSICÓTICOS

No intuito de averiguar se os antipsicóticos analisados influenciam as taxas de proliferação das células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo, foi realizada análise de proliferação celular. Para isto, 2×10^4 células viáveis/poço foram plaqueadas em triplicata em placas de 12 poços em meio de crescimento. Após 24h, quando foi verificada a adesão total das células, estas foram tratadas com meio de crescimento suplementado com clozapina (20 μ M, 30 μ M), olanzapina (20 μ M, 40 μ M, 100 μ M), e haloperidol (20 μ M, 40 μ M) durante 48h, 72h e 96h. O tempo 0 (antes do início dos tratamentos) foi utilizado como controle normalizador da curva. Em cada tempo as células foram dissociadas em solução de tripsina-EDTA, ressuspensas em PBS e contadas utilizando o citômetro de fluxo *Guava EasyCyte Flow Cytometer* (*Guava Technologies*), utilizando o software *Guava ExpressPlus 2.0* (*Guava Technologies*).

2.18. MEDIDAS DE LIPOGÊNESE

A incorporação da 2-deoxi-[³H] glicose (análogo da glicose marcado radioativamente que é transportada para o interior da célula através dos mesmos transportadores da glicose endógena; Kraegen *et al.*, 1985) em lipídeos foi utilizada para medir lipogênese (Botion e Green, 1999).

As taxas de captação de 2-deoxi-[³H] glicose pelos adipócitos isolados foram mensuradas na ausência (basal) e presença de insulina em concentração de 10 nM para efeito máximo. Para isso, foram utilizados adipócitos maduros de tecido adiposo subcutâneo (proveniente de cirurgias estéticas de lipoaspiração) dos indivíduos controle, os quais foram isolados e ressuspendidos em tampão *Krebs Ringer buffer* (concentração final de aproximadamente 5×10^5 células/mL). Fluoretina foi adicionado ao teste para inibição da captação da 2-deoxi-[³H] glicose, permitindo a determinação da incorporação inespecífica. Em seguida, cada suspensão celular (lipócrito de 10% = $\sim 5 \times 10^4$ células) foi transferida para tubos de polipropileno contendo DMSO ou clozapina, olanzapina e haloperidol (40 μ M e 100 μ M) e incubadas durante um período de 3h. Após este período, as células foram transferidas para novos tubos contendo ou não 10 nM de insulina e incubadas por 15 minutos a 37°C. Em seguida, foram adicionados 10 μ L de 2-deoxi-[³H] glicose (concentração final de 0.4 mM e 0.05 μ Ci/tubo), e após 3 minutos o transporte foi interrompido com a adição de 250 μ L de fluoretina 0.3 mM (em tampão EHB e DMSO 0.05%) a 4°C. Para avaliação da taxa de captação, as células foram transferidas para tubos de cintilação contendo 3 mL de coquetel de cintilação para determinação da radioatividade, o qual foi aferida em contador beta (*Tricarb 2100 TR, Packard Instruments*). O cálculo do índice de captação de glicose *in vitro* foi feito considerando-se a radioatividade da 2-deoxi-[³H] glicose nas células e a concentração desse composto no meio de incubação. Os resultados foram expressos em pmol/cm² de superfície celular.

2.19. ANÁLISE DE TOXICIDADE CELULAR

A ação citotóxica dos antipsicóticos durante a lipogênese foi investigada utilizando o método colorimétrico de análise de viabilidade celular XTT (*Cell Proliferation Kit II-XTT*, Roche), seguindo as especificações do fabricante.

Capítulo III

ALTERED PI3K-mTOR SIGNALING IN NON-SYNDROMIC AUTISM SPECTRUM DISORDERS

Angela May Suzuki

Camila de Oliveira Freitas Machado

Karina Griesi-Oliveira

Estevão Vadasz

Maria Rita Passos-Bueno

Andréa Laurato Sertié

ABSTRACT

Autism Spectrum Disorders (ASD) are common neurodevelopmental conditions with high phenotypic and genetic heterogeneity. Identification of common altered molecular pathways is important for understanding the disease pathophysiology and for devising more effective therapies. Dysregulation of molecular mechanisms that control protein synthesis, such as those involving PI3k/mTOR signaling, have been suggested to play an important role in ASD pathogenesis. Here, we used patient-derived Stem cells from Human Exfoliated Deciduous teeth (SHEDs) as a model system to test the hypothesis that non-syndromic ASD present altered regulation of PI3K/mTOR-linked molecular networks. Phosphorylation analysis of both mTORC1 (p-mTOR^{S2448} and p-rpS6^{S235/236}) and mTORC2 (p-AKT^{S473}) cascade components in response to changes in fetal bovine serum concentration in the culture media suggested altered activity of both mTOR-associated complexes in SHEDs derived from 2 idiopathic non-syndromic ASD patients (15% of our sample size). In addition, these cells showed an enhanced proliferative capacity at higher cell densities, which was not rescued by combined pharmacological inhibition of both PI3K and mTOR kinase activity. Altered rpS6 phosphorylation patterns and enhanced proliferative capacity was also observed, although without concomitant changes in mTOR and AKT phosphorylation, in SHEDs from another non-syndromic ASD patient harboring an inverted duplication of chromosome 15q11-13 region. Interestingly, dual inhibition of PI3K/mTOR was able to restore the increased proliferation of the cells from this patient. Altogether, our results suggest that: a) dysregulation in PI3K/mTOR networks play an important role in the pathogenesis of a subgroup of non-syndromic ASD; b) altered rpS6 activity may represent a convergence point for upstream pathways pathologically dysregulated in non-syndromic ASD patients; c) functional analysis of common molecular pathways is an interesting approach to study

genetically heterogeneous diseases, such as ASD; d) PI3K/mTOR pathway might be a promising target for therapeutic strategies in these cases.

RESUMO

Os transtornos do espectro autista (TEA) são distúrbios comportamentais e do desenvolvimento caracterizados por uma alta heterogeneidade genética e fenotípica. A identificação de vias moleculares alteradas compartilhadas pelos pacientes é fundamental para a maior compreensão da patofisiologia dos TEA e para o desenvolvimento de medidas terapêuticas mais eficazes. Diversas evidências sugerem que a desregulação de mecanismos moleculares que regulam a síntese de proteínas, tais como os mecanismos que envolvem a via de sinalização PI3K/mTOR, apresentam um papel fundamental na patogênese dos TEA. Neste trabalho nós testamos a hipótese de pacientes com TEA não-sindrômico apresentam desregulação na via de sinalização PI3K-mTOR, utilizando como modelo células-tronco mesenquimais provenientes de polpa de dente decíduo (SHEDs) de pacientes e indivíduos controles. A análise do padrão de fosforilação de proteínas constituintes tanto da via mTORC1 (p-mTORS2448 e p-rpS6S235/236) como mTORC2 (p-AKTS473) em resposta a diferentes concentrações de soro fetal bovino no meio de cultura sugeriu que SHEDs provenientes de 2 dos pacientes com autismo idiopático (15% de nossa amostra de pacientes) apresentam atividade alterada de ambos os complexos mTOR. Além disso, estas células apresentaram maior capacidade proliferativa em condições de maior densidade celular, a qual não foi revertida com a inibição farmacológica concomitante da atividade das quinases PI3K e mTOR. Alteração o padrão de fosforilação da proteína rpS6 e aumento da capacidade proliferativa também foi observada (embora sem evidências de alterações concomitantes na fosforilação de mTOR e Akt) em SHEDs provenientes de um paciente com autismo não-sindrômico

portador de uma duplicação invertida da região cromossômica 15q11-13. É interessante notar que a proliferação aumentada observada nas células deste paciente foi corrigida com a inibição farmacológica concomitante de PI3K/mTOR. Juntos, nossos resultados sugerem que: a) a desregulação das redes moleculares que envolvem a via de sinalização PI3K-mTOR parece desempenhar um papel importante na patogênese de uma parcela significativa de pacientes com TEA não-sindrômico; b) alteração na atividade da proteína rpS6 parece representar um ponto de convergência entre vias de sinalização patologicamente alteradas em pacientes com TEA não-sindrômico; c) a análise funcional de vias de sinalização alteradas compartilhadas pelos pacientes é uma abordagem interessante para o estudo de doenças geneticamente heterogêneas como os TEA; d) a via PI3K/mTOR parece constituir um alvo promissor para o desenvolvimento de novas estratégias para terapêuticas nesses pacientes.

1. INTRODUCTION

Autism Spectrum Disorders (ASD) are common complex neurodevelopmental conditions, with an estimated prevalence of approximately 1:100 (Harrington, 2010). Since no diagnostic biomarker has yet been identified, ASD are currently diagnosed on the basis of three core symptoms: impaired social interaction, communication deficits, and restricted, repetitive and stereotyped behaviors. In addition, several other features, such as intellectual impairments, epilepsy, hyperactivity, irritability and macrocephaly may also be reported in ASD patients (Zafeiriou et al., 2007).

It is well established that genetic factors play a major role in the etiology of ASD, and the heritability has been estimated to be up to 90% (Muhle, 2004). An increasing number of

rare high-impact mutations has been identified in ASD patients and, to date, several genes have already been associated to these disorders, revealing high level of genetic heterogeneity (Betancur, 2011; Xu et al., 2012). In spite of these important advances, the majority of cases (~80%) still remain idiopathic, with unknown etiology, and little is known about the pathophysiology of non-syndromic ASD (Hampson et al., 2012).

Identification of convergent molecular pathways involved in ASD can provide essential clues to understand the disease pathophysiology and to devise more effective therapies. In this regard, functional analyses of the genes already found to be mutated in ASD, especially those altered in monogenic syndromes with high prevalence of autism, have suggested that dysregulation of the molecular mechanisms that control protein synthesis at synapses, such as those involving the mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) signaling pathway, may contribute to the clinical features of ASD. Mutations in upstream regulators or downstream effectors of PI3K-mTOR pathway, including mutations in *TSC1/TSC2* (Tuberous Sclerosis syndrome), *FMR1* (Fragile-X syndrome), *PTEN* (PTEN hamartoma tumor syndrome), *NF1* (Neurofibromatosis type 1), and *eIF4E* (non-syndromic autism), lead to an increased risk for ASD (Wiznitzer, 2004; Sharma et al., 2010; Kwon et al., 2006; Dasgupta et al., 2005; Gipson et al., 2012; Neves-Pereira et al., 2009; Gkogkas et al., 2012). In addition, although the molecular mechanisms linking MECP2 and mTOR pathway have not yet been established, mTOR signaling dysregulation has also been reported in a mouse model of Rett Syndrome, in which nearly all the patients meet the criteria for ASD (Ricciardi et al., 2011).

mTOR is a serine/threonine-kinase that functions in two multiprotein complexes: mTORC1, which is sensitive to the drug rapamycin and regulates several cellular processes including protein synthesis and cell proliferation in a nutrient-sensitive manner; and mTORC2,

which is insensitive to acute rapamycin treatment but can be inhibited indirectly by chronic exposure to this drug, and regulates actin cytoskeleton, cell proliferation and survival in response to growth factors (reviewed in Laplante & Sabatini, 2012).

It is interesting to mention that, in addition to mTORC1 networks, mTORC2 signaling alterations have also been observed in neural progenitor cells of *Tsc1*^{+/-} conditional knockout mice (Huang et al., 2008; Huang et al., 2009; Carson et al., 2012); and phosphorylation of AKT at Ser473 site, a direct target of mTORC2 activity (Sarbasov et al., 2005), has also been found to be altered in several mice models of syndromic autism (Ricciardi et al., 2011; Zhou et al., 2009; Huang et al., 2008; Meikle et al., 2008; Sharma et al., 2010).

Despite the increasing evidences suggesting the involvement of mTOR-linked pathways in the pathophysiology of ASD, to date functional studies addressing mTORC1 or mTORC2 signaling activity and regulation in non-syndromic ASD have not yet been published. Thus, in this study we have made use of cultured human exfoliated deciduous teeth stem cells (SHEDs) derived from patients with non-syndromic autism as a model system to investigate these open questions.

SHEDs were chosen as the model system for several reasons. They do not require an invasive procedure to be isolated; once isolated they can be expanded in culture, constituting almost an unlimited source of patient material; they show the same early embryonic origin as neurons, and express neural progenitor markers; and they can differentiate toward functionally active neuron under appropriate conditions (Arthur et al., 2008). Furthermore, SHEDs express a variety of different signaling pathways (Griesi-Oliveira et al., 2013, manuscript submitted), and their culture conditions can be changed in order to analyze cellular behavior and cell signal transduction.

2. RESULTS

2.1) *Dysregulation of mTOR/rpS6-associated signalings is shared by a subset of non-syndromic ASD subjects*

Because PI3K-mTORC1 pathway functions as an environmental sensor of nutrient availability, we took advantage of the use of cultured SHEDs derived from patients with non-syndromic autism and controls, and examined the status of mTORC1 activity in serum-deprived (mTORC1 inhibition) and serum-stimulated (mTORC1 activation) cells.

SHED samples derived from 13 patients and 8 age- and sex-matched controls were initially submitted to a serum starvation period of 48 hours and subsequently treated or not with FBS (20%) for 30min. Total protein lysates of all SHED samples were analyzed for the phosphorylation status of p-mTOR^{S2448} (activated mTORC1 predominantly contains mTOR phosphorylated on Ser2448 site; Copp et al 2009) and p-rpS6^{S235/236}, a ribosomal protein downstream of mTORC1, by western blotting.

Under these experimental conditions, as expected, the phosphorylation levels of p-mTOR^{S2448} and p-rpS6^{S235/236} was greatly diminished in serum-deprived cells, and then reactivated in serum-stimulated cells (Figure 1A). In addition, variable changes in the phosphorylation levels of these proteins were observed in each of these conditions among samples, suggesting that mTORC1 signaling sensitivity to extracellular nutrient stimuli vary among individuals.

Therefore, as a mean to verify the individual sensitivity of the mTORC1/rpS6 axis to nutrient availability, we then quantified in each cell sample the fold change in the levels of p-mTOR^{S2448} and p-rpS6^{S235/236} between the 20% FBS stimulated condition and the FBS-deprived condition (Figure 1A). In doing so, we observed that SHEDs derived from 2 patients

(F2688 and F4289) showed a robust increase in the relative phosphorylation levels of the two mTORC1 cascade components, whereas 1 patient (F3078) showed increased relative levels of only p-rpS6^{S235/236} compared to controls. The greater fold change of p-mTOR^{S2448} and p-rpS6^{S235/236} were not due to overall difference in protein levels as total-mTOR and β -actin expression (used as loading controls) were indistinguishable between patients and controls. Increased sensitivity of rpS6 phosphorylation to extracellular nutrient status in these samples was validated by an ELISA-based colorimetric assay (Figure 1B).

Figure 1. mTORC1 signaling pathway analysis in SHEDs derived from patients with non-syndromic autism and controls. Activation of p-mTOR^{S2448} and p-rpS6^{S235/236} was analyzed in serum-deprived (0% FBS) and serum-stimulated (20% FBS) cells. p-mTOR^{S2448} levels were firstly quantified relative to loading control total-mTOR, and p-rpS6^{S235/236} levels were firstly quantified relative to loading control β -actin (western blot) or total-rpS6 (ELISA). These normalized values were then used to calculate the fold increase in the phosphorylation levels of these proteins in the 20% FBS condition over the FBS-deprived condition. **(A)** Western blot analysis of p-mTOR^{S2448} (upper panel) and p-rpS6^{S235/236} (middle panel). Band intensities were densitometrically evaluated. The bar graphs represent the fold increase in phosphorylation state of these proteins between serum-stimulated and serum-starved cells. Representative immunoblots are showed below the bar graphs. SHEDs derived from patients F2688 and F4289 showed greater fold change levels of p-mTOR^{S2448} compared to other patients and to controls [average fold increase $\pm$ SD: 10 ± 0.3 in patients F2688 and F4289; 1.2 ± 1.3 in other patients (n=11); 1.8 ± 1.3 in controls (n=8), bottom panel]. SHEDs derived from patients F2688, F4289 and F3078 showed greater fold change levels of p-rpS6^{S235/236} compared to other patients and to controls [average fold increase $\pm$ SD: 7.0 ± 5.8 in patients F2688, F4289 and F3078; 2.1 ± 0.7 in other patients (n=9); 2.5 ± 0.7 in controls (n=7)]. Due to larger sample size, the results showed are not from samples that were necessarily loaded on the same gel; however, similar results were observed when control samples (n=4) and patients F2688, F4289 and F3078 were loaded on the same gel (data not shown). **(B)** ELISA quantification of p-rpS6^{S235/236} and total-rpS6 in SHEDs from controls (n=4) and patients F2688, F4289, F3078 and F6097. The bar graphs show the fold increase in phosphorylation state of this protein between serum-stimulated and serum-deprived cells. SHEDs derived from patients F2688, F4289 and F3078 showed a robust increase in the relative phosphorylation levels of p-rpS6^{S235/236} compared to controls and to patient F6097 (in which p-rpS6^{S235/236} phosphorylation patterns were observed to be similar to controls by our western blotting analysis) [average fold increase $\pm$ SD: 6.0 ± 1.3 in patients; 2.7 ± 0.9 in controls (n=3)].

These findings suggest altered mTORC1 activity in cells from patients F2688 and F4289. It is intriguing that under these conditions, the cells from patient F3078 showed increased changes in the phosphorylation state of p-rpS6^{S6S235/236} without concomitant increased changes in the phosphorylation state of p-mTOR^{S2448} compared to controls. It has been previously proposed that p-rpS6^{S235/236} phosphorylation can also be mediated by another kinase, the ribosomal S6 kinase (RSK), downstream of the Ras-ERK signaling cascade (Roux et al., 2007; Chiang & Abraham, 2005). Thus, the enhanced p-rpS6^{S235/236} sensitivity to extracellular nutrient status observed in patient F3078 cells may be regulated in an mTOR-independent manner. Alternatively, the observed results may be due to a complex feedback signaling that regulate activation of the mTOR-rpS6 axis.

It is important to mention that when the cells from these three patients and from *controls* (n = 3) were maintained in growth medium (15% of FBS) without a prior step of serum starvation followed by serum stimulation, we did not observe any differences in the phosphorylation levels of p-mTOR^{S2448} or p-rpS6^{S235/236} between patients and controls (Figure 2A and 2B). These results suggest that alterations in mTOR/rpS6 activation in cultured ASD-derived SHEDs were not observed in stable and favorable nutritional conditions, but instead, they were detected only when the cells were submitted to changes in the extracellular environment.

Taken together, these results suggest that hypersensitivity of the signaling networks that control rpS6 activation in response to extracellular environmental changes can be observed in a significant number of cell samples from non-syndromic ASD patients (23% of our patient sample).

Figure 2. mTORC1 signaling pathway analysis in SHEDs derived from patients with non-syndromic autism and controls when the cells were cultured in stable and favorable nutritional conditions. Activation of p-mTOR^{S2448} and p-rpS6^{S235/236} were analyzed in cells cultured in growth medium (15% FBS) by western blotting. Band intensities were densitometrically evaluated. Bar graphs represent the densitometric values of p-mTOR^{S2448} normalized to total-mTOR (A), and p-rpS6^{S235/236} normalized to β-actin (B). Representative immunoblots of these proteins are showed below the bar graphs. No significant differences in the levels of p-mTOR^{S2448} and p-rpS6^{S235/236} were observed between patients and controls [average fold increase ± SD: 2.24 ± 0.4 in patients and 2.38 ± 0.4 in controls (n=3) for p-mTOR^{S2448}; 2.1 ± 0.4 in patients and 2.3 ± 0.2 in controls (n= 3) for p-rpS6^{S235/236}].

2.2) *Altered mTORC2 activity is also observed in ASD patients with mTORC1 dysregulation*

Next, in order to investigate whether altered mTORC2 activity may also be found in non-syndromic ASD, we next monitored by western blot analysis the phosphorylation status of Akt at Ser473 site (p-Akt^{S473}), a direct target of mTORC2 activity. As conducted previously, all SHED samples were initially submitted to a serum starvation period of 48 hours and subsequently treated or not with FBS (20%) for 30min. Results are expressed as the fold increase in the levels of p-Akt^{S473} between the 20% FBS stimulated and the FBS-deprived condition.

Interestingly, we observed that SHEDs derived from the patients with hypersensitivity of p-mTOR^{S2448} and p-rpS6^{S235/236} to extracellular cues, F2688 and F4289, also showed greater fold change levels of p-Akt^{S473} compared to controls (Figure 3). In contrast, neither patient F3078' cells nor cells from the other patients showed increased changes in the phosphorylation state of p-Akt^{S473} compared to controls.

Together, the results reported so far suggest that cells from patients F2688 and F4289 show enhanced signaling activity through both mTOR-associated complexes. Although the importance of mTORC2 in neuronal function and the relationship between mTORC1 and mTORC2 signaling pathways are still poorly understood, recent evidences suggest that PI3K signaling activates mTORC2 kinase activity, which in turn may control cell proliferation through key regulators of cell-cycle progression (S-phase kinase- associated protein 2/cyclin-dependent kinase inhibitor p27 axis) (Gan et al., 2011; Tato et al., 2011; Shanmugasundaram et al., 2012).

Figure 3. mTORC2 activity in SHEDs derived from patients with non-syndromic autism and controls. mTORC2 activity was measured through the analysis of p-Akt^{S473} phosphorylation in serum-starved (0% FBS) and serum-stimulated (20% FBS) cells by western blotting. Band intensities were densitometrically evaluated. p-Akt^{S473} levels were firstly quantified relative to loading control total-Akt, and the normalized values obtained were then used to calculate the fold increase of normalized p-Akt^{S473} between the 20% FBS condition and the FBS-starved condition (bar graphs). Representative immunoblots are showed below the bar graphs. SHEDs derived from patients F2688 and F4289 showed greater fold change values of p-Akt^{S473} compared to other patients and to controls [average fold increase $\pm$ SD: 7.1 ± 3.3 in patients F2688 and F4289; 1.9 ± 0.8 in other patients ($n=9$); 2.3 ± 1.2 in controls ($n=4$)].

2.3) *mTOR/rpS6 dysregulation is associated to altered proliferative capacity of patient-derived SHEDs*

Because mTOR/rpS6 networks have been linked to cell growth and cell proliferation, we next addressed whether the enhanced sensitivity of these networks to extracellular nutrients and growth factors availability in the three patients' cells described above could modify their proliferative capacity in response to different FBS concentrations. For this purpose, we used SHEDs derived from these 3 patients (we named this group of patients subgroup 2: SG2), from 3 other patients with similar rpS6 phosphorylation patterns compared to controls (as suggested by our western blot and ELISA assays; which we named subgroup 1: SG1), and from 5 control individuals. All SHEDs analyzed were initially submitted to a serum starvation period of 48 hours, in order to synchronize cells in G0/G1 phase of the cell cycle, and then cultured in DMEM containing various FBS concentrations (0.5%, 5%, 10% and 20%) for the indicated times (Figure 4).

Interestingly, we observed that SHEDs derived from patients with increased sensitivity of p-rpS6^{S235/236} to changes in extracellular stimuli (cells from SG2) could be clearly distinguished from the other patient samples analyzed (cells from SG1), which presented proliferation curves similar to those of the control group. Significant increases in cell proliferation ($p < 0.01$) could be observed mainly at 120 hours and 144 hours of serum exposure, when cells achieve confluence. These results are in concordance with the enhanced p-rpS6 activity observed in SG2 cells, which may underlie the increased mitogenic response of these cells to FBS.

Figure 4. Proliferation curves of SHEDs derived from non-syndromic autism patients and controls. SHEDs were cultured in growth medium containing various FBS concentrations and were collected and counted at the indicated time points (48, 72, 96, 120 and 144 hours). Results are expressed as the fold increase in cell number relative to 0 hr. SHEDs from patients F2688, F4289, and F3078 (SG2) showed significant increased mitogenic response to FBS at later time points of the growth curves compared to the other patients (n=3) and to controls (n=5). Two-way ANOVA with Bonferroni post tests corrections were performed for statistical analysis ** p<0.01; ***p<0.001

2.4) *Inhibition of mTOR does not revert increased proliferative rates in patients with altered p-rpS6 activity*

In order to further address whether the enhanced proliferative rates observed in SHEDs from SG2 were related to altered mTOR signaling networks, we investigated the impact of rapamycin treatment on the proliferation curves of these cells, compared to the cells from 1 SG1' patient and 3 controls.

As conducted previously, all the cells were initially submitted to a serum starvation period of 48 hours and subsequently cultured with FBS (20%) supplemented with either rapamycin (100 nM) or the vehicle (DMSO) for the indicated time points (Figure 5). Results show relative proliferative rates of treated compared to non-treated cells (vehicle only). It is noteworthy that under these experimental conditions neither cellular morphologic change nor cell death were noted, and the cells continued to proliferate, suggesting no effect on cell viability (data not shown).

As expected, we observed that rapamycin elicited an inhibitory effect on the proliferation of the cells, and the proliferative rates over a 96 hours period were very similar between all ASD patients (from SG1 and SG2) and controls. However, when cultures achieved high cell densities (between 96hr-144hr of culture), the antiproliferative effects of rapamycin were significantly less effective ($p < 0.01$) in SHEDs derived from SG2 compared to controls and to the cells from SG1 (which was included in the control group due to similar proliferative patterns compared to controls) (Figure 5). These results indicate that SG2 cells show relatively greater proliferative potential at higher cell densities (as also evidenced in Figure 4), and rapamycin treatment was unable to restore their proliferative rates to control levels under these circumstances. Together, the findings reported thus far suggest that the enhanced mTOR/rpS6 activity observed in cells from SG2 may overcome both rapamycin inhibitory effects and cell contact inhibition, allowing an increased cell proliferation at higher densities.

Figure 5. Effect of rapamycin treatment on the proliferative rates of cultured SHEDs derived from non-syndromic autism patients with increased mitogenic response to FBS and controls. SHEDs were cultured in growth medium (20% FBS) supplemented with either 100 nM rapamycin or the vehicle for the indicated time points (48, 96, and 144 hours). Bar graph represents the proliferative rates of rapamycin-treated relative to non-treated cells (vehicle only). The antiproliferative effects of rapamycin between 96hr-144hr treatment were significantly less effective in SHEDs derived from SG2 (green bar) compared to controls (gray bar, n=4). Two-way ANOVA with Bonferroni post tests corrections were performed for statistical analysis. ** p<0.01

2.5) *Dual inhibition of mTOR and PI3K activity reverts increased proliferative rates in patient with altered p-rpS6 without concomitant changes in mTOR phosphorylation*

The regulation of PI3K-mTOR networks is highly complex and involves several negative and positive feedback loops, as well as crosstalks between other signaling pathways such as Ras-ERK pathway. In this regard, it was previously reported that mTORC1 inhibition can lead to Ras-ERK activation through a PI3K-dependent negative feedback loop in human cancer (Carracedo et al., 2008). Therefore, it has been suggested that targeting the same pathway at different points or targeting different pathways simultaneously may be a more efficient therapeutic approach for patients with dysregulation in these signaling pathways.

Thus, in order to address whether combined inhibition of mTOR and PI3K would be more effective in rescuing the enhanced proliferation of the cells from SG2 at higher densities, we performed the same proliferative curves as described before, except that the cells were treated with both rapamycin (100 nM) and the PI3K inhibitor wortmannin (100 μ M). Under these conditions, although we have observed a slight synergistic effect of dual PI3K/mTOR inhibition on the proliferation rates of the cells from patients F2688 and F4289, the presence of both inhibitors was still unable to restore the elevated proliferation of these cells at higher densities (Figure 6). These results suggest that mTOR signaling to its downstream effectors may mainly control the enhanced proliferative rates of these cells at high densities, as the inhibition of an upstream kinase of the pathway did not exert a significant effect on the cells' behavior.

In contrast, combined inhibition of PI3K and mTOR in cells from patient F3078 led to an even stronger inhibition of cell proliferation at higher cell densities compared to controls (Figure 6). Although we cannot discard the involvement of mTOR activity dysregulation in this patient, these results suggest that the altered rpS6 phosphorylation patterns and the enhanced proliferative capacity observed in F3078' cells may be mediated largely via PI3K-dependent signaling, in a mechanism distinct from the one present in patients F2688 and F4289' cells.

Figure 6. Effect of rapamycin and wortmannin treatment on the proliferative rates of SHEDs derived from non-syndromic autism patients with increased mitogenic response to FBS and controls. SHEDs were cultured in growth medium (20% FBS) supplemented with either 100 nM rapamycin plus wortmannin 100 μ M, or the vehicle for the indicated time points (48, 96, and 144 hours). Bar graphs show the proliferative rates of treated relative to non-treated cells (vehicle only). The antiproliferative effects of both inhibitors between 96hr-144hr treatment continued to be significantly less effective in SHEDs derived from patients F2688 and F4289. In contrast, the combined treatment with PI3K/mTOR inhibitors in SHEDs derived from patient F3078 exerted an even stronger inhibition of cell proliferation at higher cell densities (between 96hr-144hr) compared to controls. Two-way ANOVA with Bonferroni post tests corrections were performed for statistical analysis. ** $p < 0.01$

2.6) *Disrupted PI3K/mTOR signalings in ASD SHEDs is not associated with a specific genetic architecture*

Conventional karyotyping and CNV analysis (Autism Salsa MLPA kit P343 or array comparative genomic hybridization - aCGH - analysis) did not reveal any genomic aberrations in patients F2688 and F4289 and, therefore, they remain idiopathic. In contrast, patient F3078 was found to present an inverted duplication that include the short arm (which forms a marker chromosome) and the proximal segment of the long arm that extends until q13.3 region of chromosome 15, forming a pseudodicentric chromosome (Moreira *et al.*, personal

communication) (Table 1). Copy number variations (CNVs) of this region have been consistently identified in ASD patients, and it includes several important genes for neural function, such as *GABRB3* (gamma-aminobutyric acid A receptor, beta 3), *CYFIP1* (cytoplasmic FMR1 interacting protein 1), *UBE3A* (ubiquitin protein ligase E3A) and *CHRNA7* (cholinergic receptor, nicotinic, alpha 7) (UCSC genome browser), which may contribute to ASD phenotype in this patients as well as in other patients harboring this chromosome aberration.

Interestingly, in our patient sample we identified another subject (F6097) with an inverted duplication of the same chromosomal region (15q11-q13) who did not show altered mTOR/rpS6 phosphorylation patterns in response to changes in extracellular nutrient availability (Figure 1A and 1B). These results suggest that this 'inverted duplication chromosome 15' may not account alone for the different regulation of p-rpS6^{S235/236} and the different behavior of the cells from patient F3078 under pharmacological inhibition of PI3K and mTOR. It is possible that this patient harbors a second-site mutation that contributes to the observed cellular and biochemical phenotypes, which is in keeping with the two-hit model for ASD (Leblond et al., 2012).

3. DISCUSSION

Currently, available treatments for ASD are not based upon a specific understanding of the causes of the disease in each patient and are, commonly, inadequate. These treatments can only alleviate specific symptoms such as repetitive and stereotypic behavior, hyperactivity, irritability, and aggression, but do not lead to significant improvements of social impairments (Huffman et al., 2011; Nazeer, 2011). In addition, besides being inefficient, the treatments can

be associated with significant undesirable side effects, such as weight gain and sedation (McPheeters et al., 2011; Warren et al., 2011). Thus, identifying convergent pathogenic mechanisms underlying ASD pathophysiology represents a crucial step to pave the way for more specific and efficient therapeutic interventions.

In this study we presented evidence for altered activity of both mTORC1 and mTORC2 signaling pathways in response to changes in extracellular environment in SHEDs derived from 2 patients with idiopathic non-syndromic autism (15% of our sample size). Consistent with this view, these cells showed enhanced proliferative capacity in response to FBS and altered growth response to prolonged rapamycin treatment compared to control SHEDs. In addition, even the combined inhibition of PI3K and mTOR activity showed to be inefficient to rescue enhanced proliferative rates of these cells to control levels.

We also reported evidence for increased p-rpS6^{S235/236} phosphorylation patterns and enhanced proliferative capacity in SHEDs from one patient with non-syndromic autism that harbor a complex chromosomal rearrangement involving 15q11-13 region. However, evidence for dysregulated mTORC1 or mTORC2 pathways in these cells could not be observed in our western blot analysis and, intriguingly, their enhanced proliferation rates were restored after co-administration of mTOR and PI3K inhibitors. Thus, although the mechanisms by which altered p-rpS6^{S235/236} activation and cellular proliferation are regulated in these cells are not yet understood, i.e. whether they involve mTOR-independent and ERK-dependent pathways, our results suggest that enhanced PI3K signaling may play an important role in this scenario.

Together, our results suggest that altered rpS6 activity may represent a convergence point for upstream pathways pathologically dysregulated in non-syndromic ASD patients. Phosphorylation of p-rpS6^{S235/236} has been shown to regulate the affinity of rpS6 for the 7-methylguanosine cap complex, the efficiency of the recruitment of ribosomes to mRNAs and,

therefore, mRNA translation (Roux et al., 2007). Protein synthesis drives several essential cellular processes such as cell growth and proliferation, synapse formation and plasticity; and a large body of evidence suggests that altered translational control may lead to abnormal synaptic function and neuronal connectivity in ASD (Kelleher III & Bear, 2008; Auerbach et al., 2012; Gkogkas et al., 2012).

On this basis, it is possible that protein synthesis can be altered in the three patients with hypersensitive signaling networks that regulate rpS6 activity (SG2), and that it may account for the increased proliferation rates of these cells. Currently, we are performing follow-up experiments to address this important issue. Furthermore, it might be hypothesized that the enhanced proliferation capacity at high cell densities, observed in SHEDs from SG2, may also be observed in neuronal cell types, and that altered proliferation of these cells during development may contribute to ASD phenotype. It would be interesting to know whether these patients showed macrocephaly in early postnatal periods, but, unfortunately, this correlation could not be established due to lack of data about their head circumferences at these developmental stages.

Rapamycin treatment has shown to be capable of reversing part of the neurological abnormalities in animal's models of syndromic forms of ASD, even when treatment was initiated in adult mice (Ehninger et al., 2008; Meike et al., 2008; Zhou et al., 2009). Herein, rapamycin treatment as a single agent was unable to completely restore the enhanced cell proliferation observed in cells from SG2. However, the combined administration of PI3K/mTOR inhibitors rescued the abnormal proliferation phenotype in cells from patient F3078, which was not observed in cells from the other two patients from SG2. These results suggest that combined targeting of cellular pathways involved in ASD may represent a promising therapeutic approach for an important portion of patients. In regard to cells from patients F2688 and F4289, it would be interesting to test the combination of rapamycin (or

other drugs that target mTOR and does not elicit undesirable side effects) with other agents rather than wortmannin. Alternatively, our data suggest that rpS6-targeting treatments may represent a potential therapeutic strategy for these patients. Together, our findings could have important therapeutic implications to some of these ASD patients.

It is also noteworthy that, as described in Table 1, these three patients (SG2), who seem to some extent share overlapping pathophysiological mechanisms, show variable levels of cognitive impairments. Although research on animal models of syndromic autism has suggested that dysregulated PI3K/mTOR signalings may contribute to the majority of their neurological defects, our results suggest that other genetic and environmental modifier factors may also play a role in cognitive development in these patients.

Finally, our results are in accordance with previous studies that suggest that the molecular pathomechanisms observed in ASD and related disorders are not only neuron-specific and can also be observed in non-neuronal tissues (Hoeffler et al., 2012). Our findings suggest that SHEDs can be used as an alternative patient material source to study disease pathophysiology and to refine treatment approaches for individual patients.

4. EXPERIMENTAL PROCEDURES

4.1) Subjects and clinical features

Exfoliated deciduous teeth stem cells (SHEDs) from 13 non-syndromic ASD male patients (ages 6 to 10 years old) and 8 age- and sex-matched control subjects were obtained according to previously published protocols (Kerkis et al., 2006) after signed informed consent by the parents or legal guardians. All patients included in this study are from Human Genome Research Center (University of Sao Paulo), and were diagnosed according to the

criteria defined in DSM-IV-TR. Table 1 summarizes clinical and molecular features of these patients. Fragile X Syndrome was excluded in all patients.

Patients' ID	Diagnostic	Speech	Stereotypic Behavior	Social Interaction	Other features	Etiology
F1740	?	Impaired	Yes	Impaired	Irritability	-
F2613	Typical - High functional	Impaired	Yes	Impaired		
F2688	Typical - High functional	Impaired	Yes	Impaired	Convulsion/ Increased CP(*)	-
F2735	Typical - High functional	Impaired	Yes	Impaired		-
F3078	Typical - Medium functional	Impaired	Yes	Impaired	Hyperactivity	47,XY,+inv dup(15) (q11q13)
F3535	PDDNOS	Impaired	Yes	Impaired		-
F4216	Typical	Impaired	Yes	Impaired	Hyperactivity	-
F4289	Typical - Low functional	Impaired	Yes	Impaired	Hyperactivity/ Hydrocephaly	-
F6031	?	Impaired	Yes	Impaired		-
F6097	PDDNOS	Impaired	Yes	Impaired	Hyperactivity; prominent eyes and ears, psychomotor delay	47, XY, + dup(15) (q11q13)
F6136	Typical - High functional	Impaired	Yes	Impaired		-
F6138	Typical - Low functional	Impaired	Yes	Impaired	Psychomotor delay	-
F6281	Typical - High functional	Impaired	Yes	Impaired		;

4.2) Cell culture

Primary SHEDs were grown in mesenchymal stem cell growth medium (DMEM F12 - high glucose with L-glutamine, supplemented with 15% fetal bovine serum, 1% penicillin/streptomycin, and 1% MEM Non-essential amino acids [Invitrogen, Carlsbad, CA, USA]), cultured in 5% CO₂ incubator at 37°C. Cells were passaged when the monolayer reached approximately 80% confluence by cell trypsinization.

4.3) Cell treatment for mTOR signaling pathway analysis, Cell Lysis, and Immunoblotting

To investigate whether mTOR signaling is dysregulated in patients with nonsyndromic ASD, we sought to test the sensitivity of this pathway to changes in extracellular nutrient availability by culturing the SHEDs from patients and controls in serum-free and serum-rich media. SHED samples were initially cultured in serum-free DMEM-F12 during 48 hours, and subsequently stimulated or not with 20% fetal bovine serum (FBS) for 30 min prior to protein extraction. Serum starvation was performed in order to both inhibit mTORC1 activation and reduce confounding variables due to cell cycle desynchronization, and FBS treatment was then conducted to activate mTORC1 signaling.

To investigate whether dysregulated mTOR signaling in ASD patients would be observed in favorable environmental conditions, SHED samples were plated and cultured until semi-confluence in DMEM-F12 supplemented with 15% FBS.

Total protein lysates from each condition were obtained using RIPA Buffer (1% Igepal, 0.5% SDS, 0.5% DOC, in 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl and 1 mM EDTA) containing protease and phosphatase inhibitor cocktails (*Sigma-Aldrich*). Protein concentration was determined using the bicinchoninic acid (BCA) assay kit according to manufacturer's specifications (*Bio Agency*).

20-25 µg of total cell lysates were boiled in SDS sample buffer, and separated by 8% (for mTOR and Akt labeling) or 15% (for rpS6 labeling) sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and blotted onto nitrocellulose membranes (Amersham). Membranes were then blocked for 1 hour in 5% skimmed milk-TBST-solution (137 mM Sodium Chloride, 20 mM Tris-HCl pH7.5, 0.1% Tween-20), and then incubated

overnight at 4°C with the following primary antibodies diluted in TBST-5% BSA (bovine serum albumin, Sigma-Aldrich) solution: anti-phospho AKT^{Ser473} (#9271), anti-phospho mTOR^{Ser2448} (#2971), anti-phospho rpS6^{Ser235/236} (#4858); and anti-Akt (#4691), anti-mTOR (#4512), B-actin for loading control (all antibodies were purchased from Cell Signaling Technologies, except B-actin which was purchased from Sigma). After that, membranes were successively washed (4x10 min; TBST) and then incubated with anti-mouse IgG-HRP or anti-rabbit IgG-HRP secondary antibodies (Cell Signaling Technologies) for 1 hour at room temperature. Subsequently, membranes were washed again (4x10 min; TBST) and labeling detection was performed using enhanced chemiluminescence detection system (ECL-PLUS - Amersham). Images were captured using X-Ray films (Amersham).

The intensity of the bands was determined by densitometry using NIH ImageJ software (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). p-AKT^{S473} and p-mTOR^{S2448} protein levels were quantified and normalized to the corresponding total AKT and total mTOR levels respectively. p-rpS6^{S235/236} protein levels were quantified and normalized to the corresponding β -actin levels. Subsequently, to analyze the changes in phosphorylation status of these proteins in cells cultured in different serum levels, the normalized values obtained were used to calculate the fold-change in phosphorylation state of each protein in FBS-stimulated over FBS-starved conditions [for example, the ratio of (p-mTOR^{S2448}/total-mTOR in serum-stimulated condition) to (p-mTOR^{S2448}/total-mTOR in serum-starved condition)].

4.4) ELISA assay

The PathScan® Phospho-rpS6 (Ser235/236) and Total-rpS6 Sandwich ELISA Kit (Cell Signaling Technology) were performed with 10 μ g of the same total lysates used in western blotting according to the manufacturer's recommendation. The colorimetric reactions were

measured using an automated ELISA reader. To analyze the sensitivity of p-rpS6^{S235/236} to extracellular stimuli in each individual we performed as described above. Data are presented as the mean $\pm$ standard deviation (SD) only for the control group (n = 4), which has been compared to each patient individually.

4.5) Cell Proliferation Assay and Pharmacological Treatment

SHEDs proliferation in response to different FBS concentrations was performed as follow: a density of 5,000 cells/cm² was plated to each well of a 12-well flat bottom plate (Corning) in mesenchymal stem cell growth medium. After 24 hours, when total cell adhesion was verified, the cells were serum-starved for 48 hours in DMEM-F12 without FBS. After this period (considered as the initial time point T0), the starvation medium was substituted for medium containing different concentrations of FBS (0.5%, 5%, 10% or 20%). All the cells were trypsinized and counted after 0, 48, 72, 96, 120 and 144 hours of treatment. Results are expressed as the fold increase in cell number relative to 0 hr.

To address the effects of mTOR and PI3K inhibitors on SHEDs proliferation, we performed as described above, except that 48 hours after starvation the medium was changed for mesenchymal stem cell growth medium (15% FBS) supplemented with DMSO (vehicle), or rapamycin 100 nM, or rapamycin 100 nM plus wortmannin 100 μ M. Cells were trypsinized and counted after 0, 48, 96 and 144 hours of treatment using Guava EasyCyte Flow Cytometer (Guava Technologies). Results are expressed as the fold change relative to the respective untreated cells. All the experiments were performed in triplicate.

4.7) Statistical analysis

For proliferation assay two-way ANOVA with a Bonferroni multiple comparison post-hoc t-test was performed to determine significance using Prism software (version 5.0, GraphPad). Significant levels were noted as follows: ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$.

5. REFERENCES

- Arthur A, Rychkov G, Shi S, Koblar SA, Gronthos S. (2008). Adult human dental pulp stem cells differentiate toward functionally active neurons under appropriate environmental cues. *Stem Cells*, 26, 1787-1795.
- Auerbach BD, Osterweil EK, Bear MF. (2011). Mutations causing syndromic autism define an axis of synaptic pathophysiology. *Nature*, 480, 63-68.
- Betancur C. (2011). Etiological heterogeneity in autism spectrum disorders: more than 100 genetic and genomic disorders and still counting. *Brain Res.* 1380: 42-77.
- Carracedo A, Ma L, Teruya-Feldstein J, Rojo F, Salmena L, Alimont A, Egia A, Sasaki AT, Thomas G, Kozma SC, Papa A, Nardella C, Cantley LC, Baselga J, Pandolfi PP. (2008). Inhibition of mTORC1 leads to MAPK pathway activation through a PI3K-dependent feedback loop in human cancer. *The Journal of Clinical Investigation*, 118(9):3065-3074.
- Carson RP, Fu C, Winzenburger P, Ess KC. (2012). Deletion of *Rictor* in neural progenitor cells reveals contributions of mTORC2 signaling to tuberous sclerosis complex. *Human Molecular Genetics*, 22(1): 140-52.
- Dasgupta B, Yi Y, Chen DY, Weber JD, Butmann DH. (2005). Proteomic analysis reveals hyperactivation of the mammalian target of rapamycin pathway in neurofibromatosis 1-associated human and mouse brain tumors. *Cancer Research*, 65(7): 2755-60.
- Chiang GG, Abraham RT. (2005). Phosphorylation of mammalian target of rapamycin (mTOR) at Ser-2448 is mediated by p706S kinase. *Journal of Biol. Chem.* 280, 25485-25490.
- Ehninger D, Han S, Shilyansky C, Zhou Y, Li W, Kwiatkowski DJ, Ramesh V, Silva AJ. (2008). Reversal of learning deficits in a Tsc2+/- mouse model of tuberous sclerosis. *Nature Medicine*, 14(8): 843-8.
- Gan X, Wang J, Su B, Wu D. (2011) Evidence for direct activation of mTORC2 kinase activity by phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate. *Journal of Biological Chemistry*, 286(13): 10998-11002.

- Gipson TT, Johnston MV. (2012). Plasticity and mTOR: towards restoration of impaired synaptic plasticity in mTOR-related neurogenetic disorders. *Neural Plasticity*, 2012: 486402.
- Gkogkas CCG, Khoutorsky A, Ran I, Rampakakis E, Nevarko T, Weatherill DB, Vasuta C, Yee S, Truitt M, Dallaire P, Major F, Lasko P, Ruggero D, Nader K, Lacaille JC, Sonenberg N. (2012). Autism-related deficits via dysregulated eIF4E-dependent translational control. *Nature*, 493(7432): 371-7.
- Griesi-Oliveira K, Sunaga DY, Cruz LA, Vadasz E, Passos-Bueno MR. Stem cells as a good tool to investigate dysregulated biological systems in autism spectrum disorders.
- Hampson DR, Gholizadeh S, Pacey LKKK. (2012). Pathways to drug development for autism spectrum disorders. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 19: 189-200.
- Harrington JW. (2010). The actual prevalence of autism: are we there yet? *Pediatrics*, 126(5): e1257-8.
- Hoeffler CA, Sanchez E, Hagerman RJ, Mu Y, Nguyen DV, Wong H, Whelan AM, Zukin RS, Klann E, Tassone F. (2012). Altered mTOR signaling and enhanced CYFIP2 expression levels in subjects with fragile X syndrome. *Genes Brain Behavior*, 11(3): 332-41.
- Huang J, Dibble CC, Matsuzaki M, Manning BD. (2008). The TSC1-TSC2 complex is required for proper activation of mTOR complex 2. *Mol Cell Biol*, 28(12): 4104-15.
- Huang J, Wu S, Wu CL, Manning BD. (2009). Signaling events downstream of mTOR complex 2 are attenuated in cells and tumors deficient for the tuberous sclerosis complex tumor suppressors. *Cancer Research*, 69(15): 6107-6114.
- Huffman LC, Sutcliffe TL, Tanner IS, Feldman HM. (2011). Management of symptoms in children with autism spectrum disorders: a comprehensive review of pharmacologic and complementary-alternative medicine treatments. *J. Dev. Behav. Pediatr.* 32, 56-68.
- Kelleher RJ 3rd, Bear MF. (2008). The autistic neuron: troubled translation? *Cell*, 135: 401-406.
- Kerkis I, Kerkis A, Dozortsev D, Stukart-Parsons GC, Gomes Massironi SM, Pereira LV, Caplan AI, Cerruti HF. (2006). Isolation and characterization of a population of immature dental pulp stem cells expressing OCT-4 and other embryonic stem cell markers. *Cells Tissues Organs*, 184(3-4):105-16.
- 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: 377-388.
- Laplanche M, Sabatini DM. (2012). mTOR signaling in growth control and disease. *Cell*, 149: 274-293.
- Leblond CS, Heinrich J, Delorme R, Proepper C, Betancur C, Huguet G, Konyukh M, Chaste P, Ey E, Rastam M, Anckarsäter H, Nygren G, Gillberg IC, Melke J, Toro R, Regnault B, Fauchereau F, Mercati O, Lemièrre N, Skuse D, Poot M, Holt R, Monaco AP, Järvelä I, Vanhala R, Curran S, Collier DA, Bolton P, Chiocchetti A, Klauck SM, Poustka F, Freitag CM, Waltes R, Kopp M, Duketis E, Bacchelli E, Minopoli F, Ruta L, Battaglia A, Mazzone L, Maestrini E, Sequeira AF,

- Oliveira B, Vicente A, Oliveira G, Pinto D, Scherer SW, Zelenika D, Delepine M, Lathrop M, Bonneau D, Guinchat V, Devillard F, Assouline B, Mouren MC, Leboyer M, Gillberg C, Boeckers TM, Bourgeron T. (2012). Genetic and functional analyses of SHANK2 mutations suggest a multiple hit model of autism spectrum disorders. *PLoS Genetics*, 8(2): e1002521.
- McPheeters ML, Warren Z, Sathe N, Bruzek JL, Krishnaswami S, Jerome RN, Veenstra-VanderWeele J. (2011). A systematic review of medical treatments for children with autism spectrum disorders. *Pediatrics*, 127(5): e1312-21.
- Meikle L, Pollizzi K, Egnor A, Kramvis L, Lane H, Mustafa S, Kwiatkowski J. (2008). Response of a neuronal model of tuberous sclerosis to mTOR inhibitors: effects on mTORC1 and Akt signaling lead to improved survival and function. *Journal of Neuroscience*, 28(21): 5422-5432.
- Moreira DP, Ribeiro CM, Griesi-Oliveira K, Vadazs E, Passos-Bueno MR. (2013), Personal communication.
- Muhle R, Trentacoste SV, Rapin I. (2004). The genetics of autism. *Pediatrics*. 113(5): e472-86.
- Nazeer A. (2011). Psychopharmacology of autism spectrum disorders in children and adolescents. *Pediatr. Clin. North Am.* 58, 85-97, x.
- Neves-Pereira M, Müller B, Massie D, Williams JHG, O'Brien PCM, Hughes A, Shen SB, St Clair D, Miedzybrodzka Z. (2009). Deregulation of *EIF4E*: a novel mechanism for autism. *Journal of Medical Genetics*, 46: 759-765.
- Ricciardi S, Boggio EM, Grosso S, Lonetti G, Forlani G, Stefanelli G, Calcagno E, Morello N, Landsberger N, Biffo S, Pizzorusso T, Giustetto M, Broccoli V. (2011). Reduced AKT/mTOR signaling and protein synthesis dysregulation in a Rett syndrome animal model. *Hum. Mol. Genet.* 20, 1182-1196.
- Roux PP, Shahbazian D, Vu H, Holz MK, Cohen MS, Taunton J, Sonenberg N, Blenis J. (2007). RAS/ERK signaling promotes site-specific ribosomal protein S6 phosphorylation via RSK and stimulates cap-dependent translation. *Journal of Biological Chemistry*, 282, 14056-14064.
- Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. (2005). Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 307(5712): 1298-1302.
- Shanmugasundaram K, Block K, Nayak BK, Livi CB, Venkatachalam MA, Sudarshan S. (2012). PI3K regulation of the SKP-2/p27 axis through mTORC2. *Oncogene*, doi:10.1038/onc.2012.226.
- Sharma A, Hoeffler CA, Takayasu Y, Miyawaki T, McBride SM, Klann E, Zukin RS. (2010). Dysregulation of mTOR signaling in fragile X syndrome. *Journal of Neuroscience*. 30(2): 694-702.
- Tato I, Bartrons E, Ventura F, Rosa JL. (2011). Amino acids activate mammalian target of rapamycin complex 2 (mTORC2) via PI3K/Akt signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 286(8): 6128-42.
- Warren Z, Veenstra-VanderWeele J, Stone W, Bruzek JL, Nahmias AS, Foss-Feig JH, Jerome RN, Krishnaswami S, Sathe NA, Glasser AM, Surawicz T, McPheeters ML. Therapies for children

with autism spectrum disorders. Comparative effectiveness review 26. (2011) AHRQ Publication No. 11-EHC029-EF, p110. Rockville, MD: Agency for Healthcare Research and Quality. Disponível em: <http://www.effectivehealthcare.ahrq.gov/index.cfm/search-for-guides-reviews-and-reports/?pageaction=displayproduct&productid=651>.

Wiznitzer M. (2004). Wi. Journal of Child Neurology. 19(9): 675-679.

Xu LM, Li JR, Huang Y, Zhao M, Tang X, Wei L. (2012). Autism KB: an evidence-based knowledgebase of autism genetics. Nucleic Acids Research, 40(D1): D1016-D1022.

Zafeiriou DI, Ververi A, Vargiami E. (2007). Childhood autism and associated comorbidities. Brain & Development, 29:257-272.

Zhou J, Blundell J, Ogawa S, Kwon CH, Zhang W, Sinton C, Powell CM, Parada LF. (2009). Pharmacological inhibition of mTORC1 suppresses anatomical, cellular, and behavioral abnormalities in neural-specific *Pten* Knock-out mice. Journal of Neuroscience, 29: 1773-1783.

Capítulo IV

Effects of antipsychotics with different weight gain liabilities on human *in vitro* models of adipose tissue differentiation and metabolism

Manuscrito publicado na revista “Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry”, 2011

Andréa Laurato Sertié

Angela May Suzuki

Rogério A.L. Sertié

Sandra Andreotti

Fábio B. Lima

Maria Rita Passos-Bueno

Wagner F. Gattaz

RESUMO

Ganho de peso e as anormalidades metabólicas são efeitos colaterais importantes associados com o uso de diversos antipsicóticos de segunda geração (ASG). O tecido adiposo tem sido sugerido como um alvo direto dos ASG envolvido no desenvolvimento desses efeitos adversos. Estudos recentes, principalmente utilizando células murinas, têm sugerido que os ASG aumentam tanto a adipogênese de pré-adipócitos, como o acúmulo de lipídios em adipócitos maduros, sugerindo um envolvimento direto do tecido adiposo no desenvolvimento destes efeitos colaterais. No entanto, poucos estudos foram realizados comparando os efeitos de antipsicóticos com diferentes propensões a induzir o ganho de peso em modelos humanos de neoformação e metabolismo do tecido adiposo branco *in vitro*. Desta maneira, o presente estudo teve como objetivo investigar os efeitos de antipsicóticos fortemente associados com o ganho de peso, como os ASG clozapina e olanzapina, assim como antipsicóticos com baixa associação com a indução de aumento de peso, como o ASG ziprasidona e o antipsicótico clássico (de primeira geração) haloperidol, tanto na proliferação e diferenciação adipogênica de células-tronco derivadas de tecido adiposo humano (ADSCs) como na lipogênese de adipócitos humanos maduros. Enquanto ziprasidona induziu alta taxa de morte celular durante a adipogênese e não pôde ser investigada nos ensaios posteriores, nós observamos que tanto clozapina e olanzapina, como haloperidol apresentaram um pequeno efeito estimulatório sobre a assinatura transcricional de adipogênese das ADSCs. No entanto, estas alterações na assinatura transcricional não se refletiram em um aumento significativo do acúmulo de triglicerídeos nos adipócitos diferenciados. Nossos dados também mostram que os três antipsicóticos analisados apresentaram um efeito inibitório sobre as taxas de proliferação celular das ADSCs indiferenciadas. Com relação ao metabolismo de adipócitos maduros, nós observamos que olanzapina, em sua maior concentração testada, inibiu levemente o processo de lipogênese estimulada por insulina, e haloperidol exerceu o

maior efeito inibitório no processo lipogênico, tanto em nível basal como estimulado com insulina. Em resumo, nossos resultados sugerem que um efeito direto na biologia do tecido adiposo não seja o principal mecanismo pelo qual estas ASGs induzem distúrbios metabólicos em humanos. Por outro lado, a diminuição da capacidade lipogênica mediada por haloperidol pode ser um possível mecanismo contribuindo para sua menor propensão a induzir efeitos metabólicos.

Contents lists available at ScienceDirect

Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/pnp

Effects of antipsychotics with different weight gain liabilities on human *in vitro* models of adipose tissue differentiation and metabolism

Andréa L. Sertié ^{a,*}, Angela May Suzuki ^b, Rogério A.L. Sertié ^c, Sandra Andreotti ^c, Fábio B. Lima ^c, Maria Rita Passos-Bueno ^b, Wagner F. Gattaz ^d

^a Centro de Pesquisa Experimental, Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein, São Paulo, Brazil

^b Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

^c Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

^d Laboratório de Neurociências (LIM27), Departamento e Instituto de Psiquiatria, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 April 2011

Received in revised form 11 July 2011

Accepted 28 July 2011

Available online 5 August 2011

Keywords:

Adipocyte-derived stem cells (ADSCs)

Antipsychotics

Human adipose tissue

Mature adipocytes

Metabolic abnormalities

Weight gain

ABSTRACT

Weight gain and metabolic abnormalities are serious side effects associated with the use of several second generation antipsychotics (SGA). The adipose tissue has been considered a direct SGA target involved in the development of these adverse effects. Recent studies, mainly using murine cells, have suggested that SGA increase both adipogenesis of preadipocytes and lipid accumulation in mature adipocytes. However, to date there has been little research comparing the effects of antipsychotics with different propensities to induce weight gain on human *in vitro* models of white adipose tissue neoformation and metabolism. The present study aimed to investigate the effects of antipsychotics either strongly associated with weight gain, such as the SGA clozapine and olanzapine, or not, such as the SGA ziprasidone and the classical antipsychotic haloperidol, on proliferation and adipocyte differentiation of human adipose-derived stem cells (ADSCs) and lipogenesis in human mature adipocytes. Whereas ziprasidone induced elevated levels of cell death during adipogenesis and could not be investigated further, we observed that clozapine, olanzapine and haloperidol had slight stimulatory effects on the transcriptional program of ADSCs adipogenesis. However, the observed changes in adipocyte-specific genes were not accompanied by a significant increase in triglyceride accumulation within differentiated adipocytes. Our data also showed that these three antipsychotics displayed inhibitory effects on the proliferation rates of undifferentiated ADSCs. Regarding mature adipocyte metabolism, we observed that olanzapine slightly inhibited insulin-stimulated lipogenesis at the highest concentration used, and haloperidol exerted the strongest inhibitory effects on both basal and insulin-stimulated lipogenesis. Taken together, our results suggest that a direct and potent effect of clozapine and olanzapine on adipose tissue biology is not an important mechanism by which these SGA induce metabolic disturbances in humans. On the other hand, the haloperidol-mediated downregulation of the lipogenic capacity of human adipose tissue may be a possible mechanism contributing to its lower propensity to induce serious metabolic side effects.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Second generation antipsychotic drugs (SGA) are considered to possess superior efficacy in treating both positive and negative symptoms of schizophrenia compared to first-generation antipsychotics (FGA) (e.g. haloperidol) (Bridler and Umbricht, 2003; Keefe et al., 2006). In addition, these drugs are increasingly being prescribed for other psychiatric disorders, such as bipolar disorder, autism, and depression (McDougle et al., 2008; Papakostas and Shelton, 2008; Pfeiffer et al., 2010). However, major side effects of SGA, such as clozapine and olanzapine, are weight gain and associated metabolic abnormalities including hyperglycemia, insulin resistance, type II diabetes, dyslipidemias and cardiovascular diseases (Ananth and Kolli, 2005; Casey, 2005; Newcomer, 2007; Panagiotopoulos et al., 2009).

Abbreviations: ADSCs, human adipose-derived stem cells; BMI, body mass index; C/EBP β , CCAAT/enhancer-binding protein β ; Ct, cycle threshold; Cy5, cyanine 5; DD58, DEAD-box protein 58; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; DMSO, dimethyl sulfoxide; FBS, fetal bovine serum; FGA, first-generation antipsychotics; FITC, fluorescein isothiocyanate; GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; HMBS, hydroxymethylbilane synthase; HPRT1, hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1; IBMX, 3-isobutyl-1-methylxanthine; LPL, lipoprotein lipase; NF, normalization factor; NP-40, nonidet P-40; OD, optical density; PBS, phosphate-buffered saline; PE, phycoerythrin; PPAR γ 2, peroxisome proliferator-activated receptor γ 2; SD, standard deviation; SDHA, succinate dehydrogenase complex subunit A; SGA, second generation antipsychotics; TG, triglyceride; XTT, tetrazolium salt 3'-[1-(phenylamino)-carbonyl]-3,4-tetrazolium]-bis (4-methoxy-6-nitro) benzenesulfonic acid hydrate.

* Corresponding author at: Av. Albert Einstein, 627/701, Morumbi, São Paulo-SP, Brazil. 05652-000. Tel.: +55 11 21511338; fax: +55 11 21510273.

E-mail address: andrea.serti@einstein.br (A.L. Sertié).

Although the exact mechanisms involved in SGA-induced weight gain and metabolic abnormalities are not yet fully understood, several studies have proposed that these side effects may reflect the antagonist properties of these drugs on central nervous system pathways involved in the food intake or energy expenditure, such as histaminergic, serotonergic/noradrenergic pathways (Deng et al., 2009; Han et al., 2008; Matsui-Sakata et al., 2005; Opgen-Rhein et al., 2010; Reynolds et al., 2002). Other studies have also explored a direct effect of some SGA on the biology of peripheral tissues involved in body energy homeostasis, such as the adipose tissue.

Increased white adipose tissue mass associated with obesity may be the function of both, increased adipocyte size, due to lipid accumulation within fully differentiated adipocytes, and increased adipocyte number, due to proliferation and adipogenic differentiation of progenitor cells present in the adipose tissue (Spalding et al., 2008). Recent reports have suggested that specific SGA can exert direct effects on mature rat adipocytes from visceral white adipose tissue, increasing lipogenesis and decreasing lipolysis to facilitate adipocyte lipid storage (Minet-Ringuet et al., 2007; Vestri et al., 2006). In addition, it was proposed that the SGA clozapine and olanzapine stimulate adipogenesis of the murine preadipocyte cell line 3T3L1 (Yang et al., 2007; 2009). However, there are very limited data concerning the effects of SGA on cells derived from human adipose tissue (Hemmrich et al., 2006; Pavan et al., 2009), remaining substantial uncertainties over these effects.

The present study aimed to extend the findings of prior studies and compared the effects of antipsychotics with different weight gain liabilities, such as the SGA clozapine and olanzapine and the FGA haloperidol, on proliferation and adipocyte differentiation of human adipose-derived stem cells (ADSCs), as well as lipogenesis in human mature adipocytes.

2. Material and methods

2.1. Adipocyte-derived stem cells (ADSCs) isolation and expansion

Liposuction aspirates from abdominal subcutaneous adipose tissue were obtained from 5 health female subjects (aged 24–38 years; BMI < 25 kg/m²) undergoing cosmetic surgery procedures performed under general anesthesia (Keck et al., 2010). In order to limit variables or confounding factors which might affect adipose tissue function, subjects were devoid of metabolic, endocrine, or cardiovascular diseases. The study was approved by local ethics committee, and patients gave their informed consent for using their ADSCs for the present experiments. ADSCs were isolated by collagenase digestion (0.075% collagenase in PBS; Sigma type IA collagenase) as described previously (Zuk et al., 2001), counted using the Trypan blue dye exclusion assay, and then seeded on plastic tissue culture plates at a density of 4000 cell/cm² in DMEM-low glucose medium (Invitrogen) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Invitrogen/Gibco) and antibiotics (defined as ADSCs growth medium). After achieving a density of 80–90%, cultures were trypsinized and subcultured at a 1:4 ratio. All tests were performed at passage 4.

2.2. Immunophenotyping

ADSC populations used in the experiments were analysed with specific cell surface markers to evaluate homogeneity. Cells were harvested with trypsin, centrifuged at 500 g for 5 min, washed with phosphate-buffered saline (PBS), and resuspended in PBS. Cells (1×10^5 cells/tube) were then incubated at 4 °C for 30 min with the following antibodies: CD29-PE-Cy5, CD90 (Thy-1)-PE-Cy5, CD45-FITC, CD31-PE, CD105 (SH2) and CD73 (SH3/4) (Becton Dickinson). After a second wash with PBS, samples incubated with unconjugated primary antibodies were incubated with anti-mouse-PE secondary antibody (Guava Technologies) for additional 15 min at 4 °C. Finally,

the cell suspension was washed with PBS, and 10^5 labeled cells were acquired with an EasyCyte Flow cytometer (Guava Technologies). Control samples were incubated with PBS instead of primary antibody, followed by incubation with anti-mouse-PE secondary antibody. All the plots generated were analysed with Guava ExpressPlus software (Guava Technologies).

2.3. Adipocyte differentiation and pharmacological treatment

To induce adipocyte differentiation, ADSCs were grown to confluence (defined as day 0) and then cultured in adipogenic induction medium [DMEM high glucose (25 mM) supplemented with 10% FBS, antibiotics, 1 μ M dexamethasone (Sigma), 200 μ M indomethacin (Sigma), 0.5 mM IBMX (Sigma), and 10 μ g/ml insulin (Sigma)] for 14 days, which represents the usual time needed to acquire a fully differentiated phenotype. The influence of the different antipsychotic drugs on adipogenesis was tested by supplementing the differentiation medium with clozapine (Sigma, MO, USA), olanzapine (Toronto Research Chemicals, Toronto, Canada), ziprasidone (Pfizer inc., NY, USA) or haloperidol (Sigma, MO, USA) at different concentrations during the first stage of differentiation (either for the first 3 days or for the first 7 days during differentiation). The antipsychotic drugs were used at doses similar to their therapeutic plasma concentrations [considered to be in the range of 0.6 to 1 μ M clozapine (Broich et al., 1998); 0.07–0.2 μ M olanzapine (Bergemann et al., 2004; Robinson et al., 2006); 0.1–0.25 μ M ziprasidone (Vogel et al., 2009); and 0.05 μ M haloperidol (Coryell et al., 1998)], at doses 10-fold higher than those (10 μ M clozapine; 2 μ M olanzapine; 2.5 μ M ziprasidone; 0.5 μ M haloperidol), or at 20, 30, 40 and 100 μ M. Control cells were treated with DMSO alone (solvent used to dissolve the drugs) and no effect of this solvent on adipogenesis was observed (data not shown).

2.4. Cell viability analysis during adipogenic differentiation

Cells were plated into 12-well cell culture plates (1.5×10^4 cells/well) and grown to confluence (day 0). The cells were then cultured in adipogenic induction medium supplemented with DMSO (control) or clozapine, olanzapine, ziprasidone or haloperidol at different concentrations, as described above. On day 14 after induction, the cells were trypsinized, stained with trypan blue and counted with an Automated Cell Counter (Invitrogen). The experiment was done in triplicates for each antipsychotic treatment and each cell line. The data were normalized to cell number of DMSO-treated samples.

2.5. RNA extraction, reverse transcription reactions and quantitative real time PCR

Cells for expression analysis were grown in 75 cm² plastic culture flasks. Total RNA from confluent undifferentiated ADSCs (day 0), and from cells cultured in adipogenic induction medium supplemented or not (DMSO alone) with the antipsychotics was isolated using Nucleospin RNA kit (Macherey-Nagel). RNA quality and concentration were accessed respectively by 1.5% agarose gel electrophoresis and Nanodrop ND-1000. Complementary DNA (cDNA) was produced from 1.5 μ g of total RNA using Superscript II reverse transcription kit (Invitrogen). Quantitative real-time PCR was performed using approximately 15 ng of cDNA and SYBR Green PCR master mix in an ABI Prism 7500 system (Applied Biosystems). Primers were designed using Primer Express software v2.0 (Applied Biosystems) and the amplification efficiency (E) of each primer was calculated according to the equation $E = 10^{(-1/\text{slope})}$. The expression data of the adipocyte-specific transcripts *C/EBP β* , *PPAR γ 2* and *LPL*, as well as an unrelated transcript *DDX58*, were determined by relative quantification in comparison to four endogenous controls *HMBS*, *HPRT1*, *GAPDH* and *SDHA*. GeNorm v3.4 was used to determine the most stable controls

and calculate the normalization factors (NF) (Vandesompele et al., 2002). The expression data is given by the ratio between each transcript $\Delta\Delta Ct$ ($E^{\Delta Ct}$) and NF. All cDNA samples were run in triplicates, and the threshold suggested by the instrument software was used to calculate Ct. Results were normalized to DMSO-treated control (1.0).

2.6. Oil red O staining and measurement of triglyceride content

Cells for quantitation of lipid accumulation were cultured in 12-well cell culture plates and, for each experiment, three wells per condition were used. For Oil Red O staining, following adipogenic differentiation for 14 days, cells were washed with PBS, fixed in 4% formaldehyde for 30 min and then stained with 0.6% (w/v) Oil Red O solution (60% isopropanol, 40% water) for 1 h at room temperature. Cells were then washed with 60% isopropanol three times to remove unbound dye and photographed. Stained Oil Red O was also eluted with 4% NP-40 in isopropanol (v/v) and quantified by measuring the optical absorbance at 490 nm. Oil Red O staining of undifferentiated ADSCs grown in parallel culture served as the blank sample for this assay.

Cellular triglyceride content was determined by the enzyme-colorimetric method, using a commercially available Kit (Laborlab). Results were normalized by the number of cells present in each well and were expressed as percent of control (DMSO).

2.7. Cell-proliferation analysis

A concentration of 4000 viable cells/cm² was plated to each well of a 12-well cell culture plate in ADSCs growth medium. After 24 h, when total cell adhesion was verified, the medium was changed for ADSCs growth medium supplemented or not with DMSO (control), or clozapine (20 μ M, 30 μ M), olanzapine (20 μ M, 40 μ M, 100 μ M), and haloperidol (20 μ M, 40 μ M). The cells were trypsinized at 0, 24, 48 and 72 h after plating, stained with trypan blue and counted using Guava EasyCyte Flow Cytometer (Guava Technologies). The experiment was done in triplicates for each time point and each cell line.

2.8. Lipogenesis measurement

Adipocytes from freshly excised abdominal subcutaneous adipose tissue of other 5 health female patients (aged 32–41 years; BMI < 25 kg/m²) undergoing liposuction procedures performed under general anesthesia were isolated by enzymatic digestion (0.075% collagenase type II), suspended in Krebs/Ringer/phosphate buffer (pH 7.4) containing 1% BSA and 2 mM glucose (to a final concentration of 1×10^6 cells/mL), and saturated with a gas mixture of CO₂ 5%/O₂ 95%. Aliquots of 450 μ L were then pipetted into polypropylene tubes containing [U-¹⁴C]-D-glucose (0.1 μ Ci/tube), DMSO or clozapine, olanzapine and haloperidol (40 μ M and 100 μ M) in the presence and absence of 10 nM insulin for 3 h at 37 °C in an orbital shaking water bath. After this period, the incubation medium was acidified with 200 μ L of 8N H₂SO₄ to rupture cells, and 2.5 mL of Dole's reagent (isopropanol : n-heptane : H₂SO₄, 4:1:0.25 vol/vol/vol) were added for lipid extraction. Radioactivity in the organic phase was determined by liquid scintillation counting and represented glucose incorporation into lipid. Activities of lipogenesis were normalized to protein concentrations and were expressed as percentage of control (DMSO). Lipogenesis was increased with maximal insulin concentration 1.3 to 1.5 fold (data not shown).

2.9. Cell cytotoxicity analysis during lipogenesis measurement (XTT-colorimetric assay)

Antipsychotic-induced cytotoxicity during *in vitro* lipogenesis was measured by means of a colorimetric XTT viability assay (Cell

Proliferation Kit II-XTT, Roche) in accordance with the instructions of the supplier. Briefly, adipocytes from two out of the five female subjects described above were pipetted into microcentrifuge tubes (at a density of 1×10^6 cells/tube) and treated as for the lipogenesis experiment. XTT solution was added into each tube to give a final concentration of 0.3 mg/mL, and the cells were then incubated for 3 h at 37 °C. After the reaction, resulting formazan dye was quantified with an ELISA plate reader at 450 nm whereas the absorbance correlated directly with the number of viable cells. All incubations were performed in triplicate with inclusion of a positive control (mechanical cell lysis) and a blank sample (containing media, XTT but no cells).

2.10. Statistical analysis

Data are reported as the means $\pm$ standard deviation (SD). Comparison between culture conditions was determined using Student's *t*-test, where *p* < 0.05 was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Isolation and characterization of human adipocyte-derived stem cells (ADSCs)

ADSCs were obtained from human abdominal subcutaneous adipose tissue samples (*n* = 5 female donors) and cultured for four passages. To characterize the homogeneity of the samples, they were subjected to flow cytometric analysis. We observed that these cells expressed the mesenchymal stem cell markers CD105 and CD73, the cell adhesion markers CD29 and CD90, but did not express the hematopoietic cell marker CD45 and the endothelial cell marker CD31 (Fig. 1). These findings suggest that we have isolated a relatively homogeneous population of mesenchymal cells.

All ADSC samples subjected to adipogenic differentiation showed marked alteration in cell morphology and accumulation of lipid droplets that could be stained by the lipophilic dye Oil Red O, which were completely absent in the undifferentiated cells (Fig. 2). In addition, real-time PCR analysis revealed that on day 3 of the differentiation process the expression levels of the key adipogenic transcription factors *C/EBP β* and *PPAR γ 2* were significantly increased compared to undifferentiated ADSCs (day 0); and that on day 14 after induction the expression levels of *PPAR γ 2* and *LPL*, an adipocyte-specific enzyme related to triglyceride metabolism that appears later on in the differentiation process, were also largely increased compared to undifferentiated ADSCs (Fig. 3).

3.2. Effects of antipsychotic drugs on the viability of ADSCs during adipogenic differentiation

We first examined whether clozapine, olanzapine, ziprasidone or haloperidol at different concentrations exert cytotoxic effects on

Fig. 1. Flow cytometric analysis of human adipose-derived mesenchymal stem cells (ADSCs). ADSCs cultured for four passages express characteristic mesenchymal cell surface markers. Data represent means $\pm$ SE (*n* = 4).

Fig. 2. Morphological characteristics of undifferentiated ADSCs and differentiated adipocytes derived from ADSCs. (A) Undifferentiated ADSCs, under phase contrast microscopy, display a flattened fibroblast-like morphology and were not stained by Oil red O solution. (B) Oil red O staining showed that differentiated adipocytes (on day 14 of differentiation induction) accumulate lipid droplets.

ADSCs during the adipogenic differentiation protocol. The concentrations used were similar to those detectable in the plasma of treated patients (1 μ M clozapine, 0.2 μ M olanzapine, 0.2 μ M ziprasidone, and 0.05 μ M haloperidol), or were 10-fold higher or more (20 to 100 μ M) than those.

We observed that ziprasidone induced elevated levels of cell death at all concentrations after few hours in culture, and it was not further investigated in our experiments (data not shown). Cell exposure to concentrations higher than 30 μ M of clozapine and 40 μ M of haloperidol also induced cytotoxicity after 2–3 days in culture. On the other hand, olanzapine at all concentrations tested did not appear to have any effect on cell viability (Fig. 4). Therefore, concentrations up to 30 μ M of clozapine, 100 μ M of olanzapine and 40 μ M of haloperidol displayed no significant effect on cell viability until the

end of the differentiation period and were used in subsequent experiments.

3.3. Effects of antipsychotic drugs on the adipocyte differentiation program of ADSCs

We next examined the effects of clozapine, olanzapine and haloperidol on the control of the adipocyte differentiation program. On day 3 of the differentiation process, we observed that administration of these drugs at doses similar to their therapeutic plasma concentrations or at doses 10-fold greater than those displayed no significant effects on the expression of *C/EBP β* and *PPAR γ 2*. On the other hand, administration of these drugs at higher doses induced a slight dose-dependent increase in the expression of these genes (Fig. 5A). Similar results were observed on day 14 after induction, in which increases in the expression levels of *PPAR γ 2* and *LPL* were also observed in a dose-dependent manner but only at higher antipsychotic dosages (Fig. 5B). As an internal control, no significant change in the expression pattern of a functionally unrelated gene, *DDX58*, was detected in the presence of the antipsychotic drugs (data not shown). These results indicate that all three antipsychotics at doses higher than their therapeutic plasma concentrations induced a dose-dependent increase in adipogenesis-related mRNAs.

3.4. Effects of antipsychotics on cellular triglyceride accumulation

To determine whether the observed increase in the expression of adipocyte-related genes was also accompanied by triglyceride

Fig. 3. Gene expression of early and late markers of adipocyte differentiation. Confluent ADSCs were induced to differentiate into adipocytes and the expression of (A) *C/EBP β* and *PPAR γ 2*, and (B) *PPAR γ 2* and *LPL* was analysed by quantitative real-time at days 0 and 3 and/or 14 after induction respectively. Levels of gene expression are shown relative to their levels in unexposed undifferentiated ADSCs (day 0, control=1). Data represent means $\pm$ SE ($n=4-5$). * $P<0.05$ compared with control respectively.

Fig. 4. Effects of antipsychotic drugs on the viability of the cells during adipogenic differentiation. Cell number after treatment of ADSCs for 14 days with adipogenic induction medium supplemented with DMSO (control) or indicated concentrations of clozapine, olanzapine, and haloperidol. All values were normalized by DMSO treatment (100%) and represent the means $\pm$ SE ($n=3$). Δ = Doses compatible with that detectable in the plasma of treated patients or 10-fold higher than those. * $P<0.05$ compared with control.

Fig. 5. Effect of clozapine, olanzapine and haloperidol on the expression of adipogenic genes. Confluent ADSCs were induced to differentiate into adipocytes with or without the indicated concentration of the antipsychotic drugs during the first three days of the differentiation process. At day 3 and 14, total RNA was extracted and the expression of (A) *CEBPβ* and *PPARγ2*, and (B) *PPARγ2* and *LPL* was analysed by quantitative real-time PCR respectively. Relative mRNA expression was calculated as fold increase of the control group which was induced to differentiation in the presence of solvent only (DMSO). Data represent means $\pm$ SE ($n = 4-5$). Δ = Doses compatible with that detectable in the plasma of treated patients or 10-fold higher than those. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared with control respectively.

accumulation, direct triglyceride measurements and Oil Red O staining were performed on day 14 after induction. We observed that triglyceride content of differentiated adipocytes did not change significantly in response to the antipsychotics (Fig. 6). In accordance with these results, OD value of Oil Red O eluted solution, which represents lipid droplet accumulation in the cytoplasm, did not increase significantly in the antipsychotic treated samples (data not shown). Therefore, although addition of clozapine (20 and 30 μ M), olanzapine (20, 40 and 100 μ M) and haloperidol (20 and 40 μ M) in the differentiation medium induced a comparable increase in the levels of adipocyte-specific genes, robust increase in intracellular lipid levels compared with control was not observed. In order to verify whether a longer antipsychotic treatment period had implications in the differentiation potential of ADSCs, the antipsychotic drugs (at the

same concentrations specified previously) were also added for the first 7 days during differentiation and no differences were observed between treatments (data not shown).

3.5. Effects of antipsychotics on proliferation of undifferentiated ADSCs

Effects of clozapine (20 and 30 μ M), olanzapine (20, 40 and 100 μ M) and haloperidol (20 and 40 μ M) exposure on the proliferation rates of ADSCs were also assessed. Under our experimental conditions, whereas DMSO (control) exerted no effects on ADSCs expansion, the three antipsychotic drugs at all concentrations tested exerted inhibitory effects on ADSCs proliferation, observed by a strong decrease in cell number soon after the beginning of antipsychotic treatment (data not shown).

3.6. Effects of antipsychotic drugs on lipogenesis in human mature adipocytes

Effects of clozapine, olanzapine and haloperidol on basal and insulin-stimulated lipogenesis were also assessed by measuring incorporation of labeled 14 C-glucose into total lipids. In order to obtain a clearcut effect and to be able to compare our results with those of a previous study using isolated rat adipocytes, the antipsychotics were used at 40 and 100 μ M. We first ensured that at these concentrations the antipsychotics did not exert cytotoxic effects on human mature adipocytes. At the end of the experiment, microscopic analysis of the cell suspensions did not reveal any observable cell lysis. In addition, cell viability assessed by the XTT-colorimetric assay indicated that the antipsychotics in these dosages did not induce cytotoxicity during the incubation period used in the experiment (data not shown).

We observed, under our experimental conditions, no significant effects of clozapine on basal and insulin-stimulated lipogenesis compared to control (cells treated with DMSO-100%) (Fig. 7). On the other hand, we observed that olanzapine, at the highest concentration analysed (100 μ M), significantly inhibited insulin-

Fig. 6. Effect of clozapine, olanzapine and haloperidol on cell triglyceride accumulation. Confluent ADSCs were induced to differentiate into adipocytes in the absence (DMSO) and presence of the indicated concentration of the antipsychotic drugs during the first three days of induction initiation. The doses used were those previously determined to induce the expression of adipocyte-specific genes. The content of triacylglycerol was measured at the end of the differentiation process (day 14) by a commercially available test. All values were normalized by DMSO treatment (100%) and represent means $\pm$ SE ($n = 4-5$).

Fig. 7. Effect of clozapine, olanzapine and haloperidol on basal and insulin-stimulated lipogenesis in adipocytes. Human adipocytes were incubated with DMSO or the antipsychotic drugs (at 40 and 100 µM) in the absence (basal) and presence of 10 nM insulin. Rates of lipogenesis were assessed as ^{14}C -glucose label incorporated into lipids. All values were normalized by DMSO treatment (100%) and represent means $\pm$ SE ($n = 5$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. control respectively.

stimulated rates of lipogenesis (approximately 14%), whereas haloperidol, at both concentrations, exerted the strongest inhibitory effects on both basal and insulin-stimulated *de novo* lipogenesis (approximately 15% and 17% at 40 µM and 12% and 24% at 100 µM respectively) (Fig. 7). Whereas the effects of clozapine and olanzapine on mature adipocytes are not correlated with their greater propensity to induce adiposity, our results clearly suggest that haloperidol reduces both basal and maximal insulin-stimulated rates of lipogenesis in human adipocytes *in vitro*.

4. Discussion

A clear understanding of the mechanisms involved in SGA-induced weight gain and metabolic disturbances is of great importance in clinical practice because it can help guide therapeutic decisions as well as the design of new treatments to reduce the serious metabolic side effects of these largely prescribed drugs.

It has recently been proposed that a direct effect of specific SGA on adipose tissue could provide an alternative, but not necessarily exclusive, mechanism for the adverse metabolic outcomes (Hemmrich et al., 2006; Minet-Ringuet et al., 2007; Pavan et al., 2009; Vestri et al., 2006; Victoriano et al., 2010; Yang et al., 2007, 2009). The present study focused on the effects of antipsychotics with different binding profiles and weight gain liabilities on the proliferation and differentiation of ADSCs and lipogenesis in human mature adipocytes *in vitro*.

Our results showed that the SGA clozapine and olanzapine had slight stimulatory effects on genes considered as early or late markers of adipose tissue differentiation. Our data also showed, for the first time, that haloperidol exhibited similar stimulatory effects on the expression of adipocyte-specific genes. However, these effects were observed to occur only in those cells receiving antipsychotic doses higher than that observed in the plasma of treated patients. Interestingly, the activation of the transcriptional program of adipogenesis in the cells treated with these three antipsychotic drugs was not accompanied by a significant increase in triglyceride (TG) accumulation within differentiated adipocytes. Although the reasons for these alterations in gene expression remain to be determined, our results suggest that the observed increase in expression of the adipocyte-specific genes is not sufficient to induce

significant TG accumulation, and that the differing degrees of weight gain upon use of clozapine, olanzapine and haloperidol are not related to different potential of these drugs to induce adipogenesis of progenitor cells present in the adipose tissue.

It is important to note that two previous studies using cultured human adipocyte progenitor cells reported that the addition of clozapine and olanzapine during the initial stages of adipogenic differentiation process induced a small increase in TG accumulation (about 1.3 fold compared to control) within differentiated cells (Hemmrich et al., 2006; Pavan et al., 2009). Whereas, Hemmrich et al. (2006) used similar concentrations of clozapine to those we used, Pavan et al. (2009) used a much higher concentration of clozapine and olanzapine. Thus, despite the methodological differences, the studies performed so far suggest that clozapine and olanzapine did not potentially increase adipogenesis of human adipocyte precursor cells, even at very high dosages. In addition, our findings suggest that enhanced proliferation of human ADSCs may also not be an important mechanism by which the SGA alter adipose tissue biology.

Regarding the effects of the antipsychotics on human mature adipocytes, our data revealed that whereas the SGA clozapine did not exert any significant effect on the rates of lipogenesis in isolated human adipocytes, olanzapine significantly inhibited insulin-stimulated lipogenesis at the highest concentration used. These results suggest that the effects of olanzapine on central nervous system pathways involved in regulation of energy balance and adiposity might overcome its possible direct inhibitory effect on the lipogenic capacity of human adipocytes. It is noteworthy that Vestri et al. (2006), after execution of a protocol very similar to the one we used, observed that clozapine and olanzapine (100 µM) enhanced both basal and insulin-induced lipogenesis in isolated rat adipocytes. Therefore, these findings suggest that the SGA might show species-specific effects, and this point should be taken into consideration in studying their adverse effects. Interestingly, we observed that haloperidol exerted the strongest inhibitory effects on both basal and insulin-stimulated rates of lipogenesis in isolated human adipocytes. Therefore, although further investigations are required to determine the clinical relevance of these findings, it is tempting to speculate that the haloperidol-induced reduction in lipogenic capacity

of human adipose tissue may be a mechanism contributing to its lower propensity to induce weight gain and metabolic abnormalities.

5. Conclusions

Taken together, the results obtained from the experiments conducted with these *in vitro* models suggest that a potent and direct effect of clozapine and olanzapine on adipose tissue development and metabolism is not an important mechanism by which these SGA induce metabolic disturbances in humans. We cannot rule out that these SGA have different effects on visceral adipose tissue, which is known to exhibit different biological properties compared to subcutaneous adipose tissue. In addition, our findings also point to a possible mechanism contributing to haloperidol's lower liability to cause weight gain in humans, via inhibition of the lipogenic capacity of adipocytes. Finally, our data suggest that, due to species related differences, the use of cells derived from human adipose tissue represents a more biologically relevant model than murine cells for studying the effects of antipsychotic drugs on this tissue. It will be a major challenge to investigate *in vivo* the exact effects of these antipsychotic drugs on human adipose tissue development and metabolism.

Authors' contributions

ALS, FBL, MRPB and WFG conceived and designed the experiments. ALS, AMS, RALS and SA performed the experiments. ALS wrote the paper. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

We are grateful to all of the subjects who participated in this work. We thank Dr. Luiz Alexandre Tissiane and Dr. Rogério Woisky for providing us with lipoaspirate samples. We thank Meire Aguenta and Bruno Pimenta for technical assistance, and Natássia Vieira for advising on the experiments. We thank Constância G. Urbani for secretarial assistance. This work was supported by grants from Pfizer Brazil, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

References

Ananth J, Kolli S. Atypical antipsychotic agents and increased risk of diabetes: class action or differential action? *Expert Opin Drug Saf* 2005;4(1):55–68.
 Bergemann N, Frick A, Parzer P, Kopitz J. Olanzapine plasma concentration, average daily dose, and interaction with co-medication in schizophrenic patients. *Pharmacopsychiatry* 2004;37(2):63–8.
 Bridler R, Umbricht D. Atypical antipsychotics in the treatment of schizophrenia. *Swiss Med Wkly* 2003;133(5–6):63–76.
 Broich K, Heinrich S, Marneros A. Acute clozapine overdose: plasma concentration and outcome. *Pharmacopsychiatry* 1998;31(4):149–51.
 Casey DE. Metabolic issues and cardiovascular disease in patients with psychiatric disorders. *Am J Med* 2005;118(Suppl 2):15S–22S.

Coryell W, Miller DD, Perry PJ. Haloperidol plasma levels and dose optimization. *Am J Psychiatry* 1998;155(1):48–53.
 Deng C, Weston-Green K, Huang XF. The role of histaminergic H1 and H3 receptors in food intake: a mechanism for atypical antipsychotic-induced weight gain? *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2009;34(1):1–4.
 Han M, Newell K, Zavitsanos K, Deng C, Huang XF. Effects of antipsychotic medication on muscarinic M1 receptor mRNA expression in the rat brain. *J Neurosci Res* 2008;86(2):457–64.
 Hemmrich K, Gummertsbach C, Pallua N, Luckhaus C, Fehsel K. Clozapine enhances differentiation of adipocyte progenitor cells. *Mol Psychiatry* 2006;11(11):980–1.
 Keck M, Zeyda M, Gollinger K, Burjak S, Kamolz LP, Frey M, et al. Local anesthetics have a major impact on viability of preadipocytes and their differentiation into adipocytes. *Plast Reconstr Surg* 2010;126(5):1500–5.
 Keefe RS, Young CA, Rock SL, Purdon SE, Gold JM, Breier A. HGGN Study Group. One-year double-blind study of the neurocognitive efficacy of olanzapine, risperidone, and haloperidol in schizophrenia. *Schizophr Res* 2006;81(1):1–15.
 Matsui-Sakata A, Ohtani H, Sawada Y. Receptor occupancy-based analysis of the contributions of various receptors to antipsychotic-induced weight gain and diabetes mellitus. *Drug Metab Pharmacokinet* 2005;20(5):368–78.
 McDougle CJ, Stigler KA, Erickson CA, Posey DJ. Atypical antipsychotics in children and adolescents with autistic and other pervasive developmental disorders. *Clin Psychiatry* 2008;4:15–20.
 Minet-Ringuet J, Even PC, Valet P, Carpené C, Visentin V, Prévot D, et al. Alterations of lipid metabolism and gene expression in rat adipocytes during chronic olanzapine treatment. *Mol Psychiatry* 2007;12(6):562–71.
 Newcomer JW. Metabolic considerations in the use of antipsychotic medications: a review of recent evidence. *J Clin Psychiatry* 2007;68(Suppl 1):20–7.
 Opgen-Rhein C, Brandl EJ, Müller DJ, Neuhaus AH, Tiwari AK, Sander T, et al. Association of HTR2C, but not LEP or INSIG2, genes with antipsychotic-induced weight gain in a German sample. *Pharmacogenomics* 2010;11(6):773–80.
 Panagiotopoulos C, Ronsley R, Davidson J. Increased prevalence of obesity and glucose intolerance in youth treated with second-generation antipsychotic medications. *Can J Psychiatry* 2009;54(11):743–9.
 Papakostas GI, Shelton RC. Use of atypical antipsychotics for treatment-resistant major depressive disorder. *Curr Psychiatry Rep* 2008;10(6):481–6.
 Pavan C, Vindigni V, Michelotto L, Rimessi A, Abatangelo G, Cortivo R, et al. Weight gain related to treatment with atypical antipsychotics is due to activation of PKC-beta. *Pharmacogenomics* 2009;10(5):408–17.
 Pfeifer JC, Kowatch RA, DelBello MP. Pharmacotherapy of bipolar disorder in children and adolescents: recent progress. *CNS Drugs* 2010;24(7):575–93.
 Reynolds GP, Zhang ZJ, Zhang XB. Association of antipsychotic drug-induced weight gain with a 5-HT2C receptor gene polymorphism. *Lancet* 2002;359(9323):2086–7.
 Robinson KA, Yacoub Wasef SZ, Buse MG. At therapeutic concentrations, olanzapine does not affect basal or insulin-stimulated glucose transport in 3T3-L1 adipocytes. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2006;30(1):93–8.
 Spalding KL, Arner E, Westermark PO, Bernard S, Buchholz BA, Bergmann O, et al. Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature* 2008;453(7196):783–7.
 Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 2002;3(7).
 Vestri HS, Maianu L, Moellering DR, Garvey WT. Atypical antipsychotic drugs directly impair insulin action in adipocytes: effects on glucose transport, lipogenesis, and antilipolysis. *Neuropsychopharmacology* 2006;32(4):765–72.
 Victoriano M, de Beaupre R, Naour N, Guerre-Millo M, Quignard-Boulangé A, Huneau JF, et al. Olanzapine-induced accumulation of adipose tissue is associated with an inflammatory state. *Brain Res* 2010;1350:167–75.
 Vogel F, Gansmüller R, Leiblein T, Dietmaier O, Wassmuth H, Gründer G, et al. The use of ziprasidone in clinical practice: analysis of pharmacokinetic and pharmacodynamic aspects from data of a drug monitoring survey. *Eur Psychiatry* 2009;24(3):143–8.
 Yang LH, Chen TM, Yu ST, Chen YH. Olanzapine induces SREBP-1-related adipogenesis in 3T3-L1 cells. *Pharmacol Res* 2007;56(3):202–8.
 Yang Z, Yin JY, Gong ZC, Huang Q, Chen H, Zhang W, et al. Evidence for an effect of clozapine on the regulation of fat-cell derived factors. *Clin Chim Acta* 2009;408(1–2):98–104.
 Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 2001;7(2):211–28.

CAPÍTULO V – DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

Neste trabalho foi inicialmente investigado se pacientes com autismo não-sindrômico compartilham alterações na via de sinalização PI3K-mTOR, a qual está envolvida em diversos aspectos do desenvolvimento neuronal, formação, maturação e funcionamento das sinapses, assim como com a patofisiologia de síndromes monogênicas que apresentam alta prevalência de TEA em seu quadro clínico.

Como modelo experimental foram utilizadas culturas de células-tronco mesenquimais provenientes de polpa de dente decíduo (SHEDs) de pacientes e controles.

O cultivo das SHEDs em meios de cultura com diferentes estímulos nutricionais após período de carenciamento mostrou que aproximadamente 20% dos pacientes analisados (F2688, F4289 e F3078 – SG2) apresentaram maior sensibilidade da proteína ribossomal rpS6, *downstream* das vias de sinalização PI3K-mTOR e Ras-ERK, à presença de nutrientes e fatores de crescimento extracelulares. Ainda, foi observado aumento da capacidade proliferativa das células desses pacientes (SG2) quando comparadas com as células controles, sobretudo quando as células dos pacientes são cultivadas em alta densidade.. Os TEA frequentemente envolvem supercrescimento de algumas regiões do cérebro, como o córtex pré-frontal, durante os primeiros anos de vida devido, entre outro motivos, a um número excessivo de neurônios (Courchesne et al., 2011). Nossos dados sugerem que a atividade anormal de vias de sinalização que controlam a proteína rpS6 pode estar diretamente relacionada a esta desregulação da proliferação celular, e apoiam a hipótese de que o controle inadequado da proliferação celular durante o desenvolvimento contribui para as anormalidades observadas em pelo menos uma parcela dos pacientes.

Os resultados aqui obtidos sugerem também que a triagem inicial de moléculas *downstream* de vias de sinalização celular, moléculas estas que constituem pontos convergentes de diferentes vias, pode possibilitar a identificação de alterações funcionais presentes em um número maior de pacientes, mesmo que estes pacientes apresentem diferentes causas etiológicas primárias. Ainda, tais moléculas podem servir como importantes alvos terapêuticos no tratamento desses pacientes.

Contudo, é evidente que o entendimento mais aprimorado das vias biológicas comprometidas nos pacientes requer a análise de moléculas *upstream* destas vias. Isto foi observado neste trabalho uma vez que apenas dois dos três pacientes com alteração na atividade de rpS6 (F2688 e F4289) compartilham alteração em mTOR (evidências indicam alteração tanto em mTORC1 como em mTORC2). A compreensão das vias de sinalização alteradas é também muito importante para a escolha de medidas terapêuticas mais apropriadas que visam modular especificamente tais vias de sinalização nos pacientes.

A modulação da capacidade proliferativa aumentada nas SHEDs provenientes do paciente F3078 por meio do uso de inibidores das quinases PI3K e mTOR sugere a adequação da utilização destas células para o estudo da ação de fármacos sobre o comportamento celular alterado, assim como para a triagem de drogas que agem sobre vias de sinalização alteradas nos pacientes. Isto sugere que as SHEDs constituem um sistema-modelo bastante atrativo para farmacologia dos TEA.

É interessante comentar que, embora grande parte dos tratamentos farmacológicos para os TEA não seja fundamentada nos mecanismos moleculares e celulares envolvidos na patofisiologia destes transtornos, e muitos pacientes se mostram não responsivos a determinados tratamentos, as drogas antipsicóticas atípicas como as utilizadas neste trabalho influenciam no funcionamento das vias PI3K-AKT e MAPKs (revisado por Hunsberger et al.,

2009). Desta maneira, seria interessante investigar a eficácia terapêutica desses psicofármacos em grupos de pacientes com e sem alterações nessas vias de sinalização na tentativa de verificar se existe alguma relação entre esses fatores.

Efeitos adversos importantes dos psicofármacos atualmente utilizados para o tratamento dos pacientes com TEA são o ganho de peso e os distúrbios metabólicos associados. Na tentativa de desvendar mecanismos subjacentes a esses efeitos metabólicos, a segunda parte deste trabalho investigou se a ação direta de antipsicóticos sobre o tecido adiposo poderia contribuir para o desenvolvimento desses efeitos adversos. Foram utilizados como modelos células-tronco mesenquimais (ADSCs) e adipócitos maduros extraídos de tecido adiposo subcutâneo (ADSCs) de indivíduos controles, as quais são capazes de se diferenciar em adipócitos maduros quando estimuladas adequadamente. Os resultados obtidos mostraram que, ao contrário do que havia sido observado em modelos animais, os antipsicóticos de segunda geração analisados (clozapina e olanzapina, que conferem maior risco de ganho ponderal) não exercem um efeito significativo sobre a proliferação, a diferenciação, e o metabolismo do tecido adiposo humano *in vitro*. Como consequência, esses resultados sugerem que essas drogas devem agir primariamente sobre sistemas centrais que regulam o peso e o metabolismo. Esses dados ilustram também a importância do desenvolvimento de modelos experimentais adequados para investigar os mecanismos pelos quais estes psicofármacos atuam no SNC, o que pode levar ao desenvolvimento de tratamentos psicoterápicos que não elicitam tais efeitos metabólicos nocivos.

Dessa forma, com o desenvolvimento deste trabalho concluímos que:

1. O estudo de vias de sinalização celular constitui uma abordagem importante para o melhor entendimento da patofisiologia de doenças com grande heterogeneidade

genética como os TEA, uma vez que mecanismos patofisiológicos comuns podem ser compartilhados pelos pacientes.

2. Alterações nas vias de sinalização PI3K-mTOR parecem contribuir para a patofisiologia de pelo menos uma parcela dos pacientes com TEA não-sindrômico.
3. O estudo da atividade da proteína rpS6 pode servir como um método de triagem inicial dos pacientes, possibilitando a identificação de um número maior de pacientes que apresentam alterações em vias de sinalização associadas à PI3K. Contudo, o estudo subsequente de vias *upstream* deve ser conduzido nos pacientes que apresentarem alterações em rpS6 na tentativa de se desvendar quais vias de sinalização estão de fato comprometidas.
4. Os mecanismos moleculares observados nos TEA parecem não ser restritos às células nervosas, podendo ser observados também em outros tipos celulares. As SHEDs parecem constituir uma fonte alternativa de material de pacientes propícias para o estudo da patofisiologia de doenças geneticamente heterogêneas, e para o estudo de estratégias terapêuticas para os pacientes.
5. A ação direta sobre o tecido adiposo de antipsicóticos de segunda geração (como a olanzapina e a clozapina) parece não constituir um mecanismo importante associado ao ganho de peso e às alterações metabólicas apresentadas pelos pacientes tratados com tais fármacos.

RESUMO

Os transtornos do espectro autista (TEA) são distúrbios neuropsiquiátricos bastante comuns, graves, e que propiciam grande impacto social e financeiro. A identificação de vias moleculares e processos celulares alterados que são compartilhados pelos pacientes, mesmo que estes apresentem causas etiológicas distintas, pode contribuir de forma significativa para o entendimento de sua patofisiologia desses transtornos. Ainda, a identificação destas vias pode propiciar o desenvolvimento de abordagens terapêuticas mais eficientes, uma vez que o uso de medicamentos nos TEA ainda é inadequado, envolvendo baixa melhora funcional e diversos efeitos colaterais, como o ganho excessivo de peso e anormalidades metabólicas associadas. Neste trabalho, selecionamos como uma primeira abordagem o estudo da via de sinalização PI3K-mTOR em pacientes com TEA não-sindrômico, via esta envolvida com diversos aspectos do desenvolvimento e funcionamento neuronal, assim como com a patofisiologia de síndromes monogênicas que apresentam alta prevalência de TEA em seu quadro clínico. Foram utilizadas como modelo experimental *in vitro* células-tronco mesenquimais provenientes de polpa de dente decíduo (SHEDs) de pacientes e indivíduos controles. Os resultados aqui obtidos sugerem a importância da desregulação da via PI3K/mTOR na patofisiologia de uma parcela importante dos casos de TEA não-sindrômico. Ainda, observamos que as células dos pacientes com alterações nessa via de sinalização apresentam maior capacidade proliferativa, e que a modulação deste fenótipo alterado por meio do uso concomitante de inibidores de PI3K e mTOR nas células de um destes pacientes sugere esta via como um alvo promissor para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para estes pacientes. Em seguida, na tentativa de desvendar os mecanismos subjacentes aos efeitos metabólicos adversos associados com o uso de antipsicóticos prescritos para o tratamento de pacientes com TEA, investigamos os efeitos destes psicofármacos sobre a biologia do tecido adiposo humano. Foram utilizadas como modelos *in*

vitro células-tronco (ADSCs) e adipócitos maduros derivados de tecido adiposo humano de indivíduos controles. Os resultados obtidos sugerem que a ação direta dos antipsicóticos com alta propensão ao ganho de peso (como a olanzapina e a clozapina) sobre a proliferação, diferenciação, e o metabolismo do tecido adiposo humano parece não constituir um mecanismo importante associado ao ganho de peso apresentado pelos pacientes, e que a ação desses medicamentos sobre os sistemas centrais que regulam o peso e o metabolismo deve ser o mecanismo principal levando aos efeitos metabólicos adversos. Juntos, os resultados gerados neste trabalho podem, de certa forma, contribuir para da farmacoterapia dos TEA.

ABSTRACT

Autism spectrum disorders (ASD) are common neuropsychiatric disorders, which has serious social and economic impacts. Identification of common molecular and cellular processes altered in patients, despite the underlying genetic heterogeneity, can contribute significantly to our understanding of the disease pathophysiology and can help to develop more effective treatments, since available pharmacotherapy for ASD is inefficient and frequently associated with adverse side effects, such as weight gain and metabolic disturbances. Here, we used patient-derived Stem cells from Human Exfoliated Deciduous teeth (SHEDs) as *an intro* model system to investigate whether non-syndromic ASD patients show altered regulation of PI3K/mTOR signaling pathway, which is involved in multiple aspects of neuronal development and physiology, and in the pathogenesis of monogenic syndromes that share features with ASD. Our results suggest that dysregulation of PI3K/mTOR-linked networks play an important role in the pathogenesis of a subgroup of non-syndromic ASD. In addition, we found enhanced proliferative capacity in cells with altered

PI3K/mTOR activity, which was rescued in one of these patients through combined pharmacological inhibition of both PI3K and mTOR kinase activity, suggesting that PI3K-mTOR signaling is a promising target for the development of new therapeutic approaches for these individuals. Next, in an attempt to better understand the mechanisms underlying the metabolic side effects of the antipsychotics prescribed for ASD treatment, we investigated the effects of some of these drugs on the biology of human adipose tissue using as *in vitro* model systems human adipose-derived stem cells (ADSCs) and mature adipocytes. Our results suggest that a direct and potent effect of antipsychotics with high weight gain liability (such as clozapine and olanzapine) on cell proliferation, differentiation, and metabolism of human adipose tissue is not an important mechanism by which these drugs induce metabolic disturbances. Consequently, our results suggest that these side effects may mainly reflect the action of these drugs on central pathways involved in weight control and metabolism. Together, our results can, to some extent, contribute to improving pharmacotherapy of ASD.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- American Psychiatric Association: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders: Fourth Edition (DSM-IV). Washington D.C.: American Psychiatric Association; 1994.
- Amir, R. E.; Van den Veyver, I. B.; Wan, M.; Tran, C. Q.; Francke, U.; Zoghbi, H. Y. Rett syndrome is caused by mutations in X-linked *MECP2*, encoding methyl-CpG-binding protein 2. *Nature Genetics*, v. 23, p. 185-188, 1999.
- Arevalo, M. A.; Rodriguez-Tebar, A. Activation of casein kinase II and inhibition of phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10 phosphatase by nerve growth factor/p75NTR inhibit glycogen synthase kinase-3beta and stimulate axonal growth. *Molecular Biology of the Cell*, v. 17, n. 8, p. 3369-3377, 2006.
- Arthur, A.; Rychkov, G.; Shi, S.; Koblar, S. A.; Gronthos, S. Adult human dental pulp stem cells differentiate toward functionally active neurons under appropriate environmental cues. *Stem Cells*, v. 26, n. 7, p. 1787-95, 2008.
- Baranek, G. T.; Boyd, B. A.; Poe, M. D.; David, F. J.; Watson, L. R. Hyperresponsive sensory patterns in young children with autism, developmental delay, and typical development. *American Journal of Mental Retardation*, v. 112, p. 233-245, 2007.
- Bartlett, C. W.; Goedken, R.; Vieland, V. J. Effects of updating linkage evidence across subsets of data: reanalysis of the autism genetic resource exchange data set. *American Journal of Human Genetics*, v. 76, n. 4, p. 688-95, 2005.
- Bauman, ML. Medical comorbidities in autism: challenges to diagnosis and treatment. *Neurotherapeutics*, v. 7, p. 320-7, 2010.
- Bissler, J. J.; McCormack, F. X.; Young, L. R.; Elwing, J. M.; Chuck, G.; Leonard, J. M.; Schmithorst, V. J.; Laor, T.; Brody, A. S.; Bean, J.; Salisbury, S.; Franz, D. N. Sirolimus for angiomyolipoma in tuberous sclerosis complex or lymphangiomyomatosis. *The New England Journal of Medicine*, v. 358, n. 2, p. 140-51, 2008.
- Böckers, T. M.; Segger-Junius, M.; Iglauder, P.; Bockmann, J.; Gundelfinger, E. D.; Kreutz, M. R.; Richter, D.; Kindler, S.; Kreienkamp, H. J. Differential expression and dendritic transcript localization of Shank family members: identification of a dendritic targeting element in the

- 3' untranslated region of Shank1 mRNA. *Molecular and Cellular Neuroscience*, v. 1, p. 182-190, 2004.
- Bondy, B.; Spellmann, I. Pharmacogenetics of antipsychotics: useful for the clinician? *Current Opinion in Psychiatry*, v. 20, n. 2, p. 126-30, 2007.
- Botion, L. M.; Green, A. Long-term regulation of lipolysis and hormone-sensitive lipase by insulin and glucose. *Diabetes*, v. 48, n. 9, p. 1691-7, 1999.
- Boyd, B. A.; Baranek, G. T.; Sideris, J.; Poe, M. D.; Watson, L. R.; Patten, E. et al. Sensory features and repetitive behaviors in children with autism and developmental delays. *Autism Research*, v. 3, p. 78-87, 2010.
- Brandt, N.; Franke, K.; Rasin, M. R.; Baumgart, J.; Vogt, J.; Khrulev, S.; Hassel, B.; Pohl, E. E.; Sestan, N.; Nitsch, R.; Schumacher, S. The neural EGF family member CALEB/NGC mediates dendritic tree and spine complexity. *The EMBO Journal*, v. 26, n. 9, p. 2371-2386, 2007.
- Brown, V.; Jin, P.; Ceman, S.; Darnell, J. C.; O'Donnell, W. T.; Tenenbaum, S. A.; Jin, X.; Feng, Y.; Wilkinson, K. D.; Keene, J. D.; Darnell, R. B.; Warren, S. T. Microarray identification of FMRP-associated brain mRNAs and altered mRNA translational profiles in fragile X syndrome. *Cell*, v. 107, n. 4, p. 477-87, 2001.
- Buie, T.; Campbell, D. B.; Fuchs III, G. J.; Furuta, G. T.; Levy, J.; VandeWater, J.; Whitaker, A. H.; Atkins, D.; Bauman, M. L.; Beaudet, A. L.; Carr, E. G.; Gershon, M. D.; Hyman, S. L.; Jirapinyo, P.; Jyonouchi, H.; Kooros, K.; Kushak, R.; Levitt, P.; Levy, S. E.; Lewis, J. D.; Murray, K. F.; Natowicz, M. R.; Sabra, A.; Wershil, B. K.; Weston, S. C.; Zeltzer, L.; Winter, H. Evaluation, diagnosis, and treatment of gastrointestinal disorders in individuals with ASDs: a consensus report. *Pediatrics*, v. 125, p. S1-S8, 2010.
- Burgin, K. E.; Waxham, M. N.; Rickling, S.; Westgate, S. A.; Mobley, W. C.; Kelly, P. T. In situ hybridization histochemistry of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase in developing rat brain. *The Journal of Neuroscience*, v. 6, p. 1788-1798, 1990.
- Buxbaum, J. D. Multiple rare variants in the etiology of autism spectrum disorders. *Dialogues in Clinical Neuroscience*. v. 11, n. 1, p. 35-43, 2009.

- Carson, R. P.; Fu, C.; Winzenburger, P.; Ess, K. C. Deletion of *Rictor* in neural progenitor cells reveals contributions of mTORC2 signaling to tuberous sclerosis complex. *Human Molecular Genetics*, v. 22, n. 1, p. 140-52, 2012.
- Chadborn, N. H.; Ahmed, A. I.; Holt, M. R.; Prinjha, R.; Dunn, G. A.; Jones, G. E.; Eickholt, B. J. PTEN couples Sema3A signaling to growth cone collapse. *Journal of Cell Science*, v. 119(Pt 5), p. 951-957, 2006.
- Chakrabarti, S.; Fombonne, E. Pervasive developmental disorders in preschool children: confirmation of high prevalence. *American Journal of Psychiatry*, v. 162, p. 1133-1141, 2005.
- Cohen, S. A.; Fitzgerald, B. J.; Khan, S. R.; Khan, A. The effect of a switch to ziprasidone in an adult population with autistic disorder: chart review of naturalistic, open-label treatment. *Journal of Clinical Psychiatry*, v. 65, p. 110-113, 2004.
- Constantino, J. N.; Zhang, Y.; Frazier, T.; Abbacchi, A. M.; Law, P. Sibling recurrence and the genetic epidemiology of autism. *The American Journal of Psychiatry*, v. 167, n. 11, p. 1349-1356, 2010.
- Cosker, K. E.; Eickholt, B. J. Phosphoinositide 3-kinase signaling events controlling axonal morphogenesis. *Biochemical Society Transactions*, v. 35(Pt 2), p. 207-210, 2007.
- Courchesne, E.; Redcay, E.; Kennedy, DP. The autistic brain: birth through adulthood. *Current Opinion in Neurology*, v. 17, n. 4, p. 489-96, 2004.
- Courchesne, E.; Mouton, P. R.; Calhoun, M. E.; Semendeferi, K.; Ahrens-Barbeau, C.; Hallet, M. J.; Barnes, C. C.; Pierce, K. Neuron number and size in prefrontal cortex of children with autism. *The Journal of the American Medical Association*, v. 306, n. 18, p. 2001-10, 2011.
- Cuscó, I.; Medrano, A.; Gener, B.; Vilardell, M.; Gallastegui, F.; Villa, O.; González, E.; Rodríguez-Santiago, B.; Vilella, E.; Del Campo, M.; Pérez-Jurado, L. A. Autism-specific copy number variants further implicate the phosphatidylinositol signaling pathway and the glutamatergic synapse in the etiology of the disorder. *Human Molecular Genetics*, v. 18, n. 10, p. 1795-1804, 2009.
- Dabora, S. L.; Franz, D. N.; Ashwal, S.; Sagalowsky, A.; DiMario, F. J. Jr.; Miles, D.; Cutler, D.; Krueger, D.; Uppot, R. N.; Rabenou, R.; Camposano, S.; Paolini, J.; Fennessy, F.; Lee, N;

- Woodrum, C.; Manola, J.; Garber, J.; Thiele, E. A. Multicenter phase 2 trial of sirolimus for tuberous sclerosis: kidney angiomyolipomas and other tumors regress and VEGF-D levels decrease. *PLoS One*, v. 6, n. 9, e23379, 2011.
- Darnell, J. C.; Van Driesche, S. J.; Zhang, C.; Hung, K. Y.; Mele, A.; Fraser, C. E. Stone E. F.; Chen, C.; Fak, J. J.; Chi, S. W.; Licatalosi, D. D.; Richter, J. D.; Darnell, R. B. FMRP stalls ribosomal translocation on mRNAs linked to synaptic function and autism. *Cell*, v. 146, n. 2, p. 247-261, 2011.
- Dasgupta, B.; Yi, Y.; Chen, D. Y.; Weber, J. D.; Butmann, D. H. Proteomic analysis reveals hyperactivation of the mammalian target of rapamycin pathway in neurofibromatosis 1-associated human and mouse brain tumors. *Cancer Research*, v. 65, n. 7, p. 2755-60, 2005.
- Dayas, C. V.; Smith, D. W.; Dunkley, P. R. An emerging role for the mammalian target of rapamycin in “pathological” protein translation: relevance to cocaine addiction. *Frontiers in Pharmacology*, v. 3, n. 13, p. 1-12, 2012.
- Dementieva, Y. A.; Vance, D. D.; Donnelly, S. L.; Elston, L. A.; Wolpert, C. M.; Ravan, S. A.; DeLong, G. R.; Abramson, R. K.; Wright, H. H.; Cuccaro, M. L. Accelerated head growth in early development of individuals with autism. *Pediatric Neurology*, v. 32, n. 2, p. 102-8, 2005.
- Deng, C.; Weston-Green, K.; Huang, X. F. The role of histaminergic H1 and H3 receptors in food intake: a mechanism for atypical antipsychotic-induced weight gain? *Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry*, v. 34, n. 1, p. 1-4, 2009.
- Durand, C. M.; Betancur, C.; Boeckers, T. M.; Bockmann, J.; Chaste, P.; Fauchereau, F.; Nygren, G.; Rastam, M.; Gillberg, I. C.; Anckarsäter, H.; Sponheim, E.; Goubran-Botros, H.; Delorme, R.; Chabane, N.; Mouren-Simeoni, M. C.; de Mas, P.; Bieth, E.; Rogé, B.; Héron, D.; Burglen, L.; Gillberg, C.; Leboyer, M.; Bourgeron, T. Mutations in the gene encoding the synaptic scaffolding protein SHANK3 are associated with autism spectrum disorders. *Nature Genetics*, v. 39, n. 1, p. 25-7, 2007.
- Ebert, D. H.; Greenberg, M. E. Activity-dependent neuronal signaling and autism spectrum disorder. *Nature*, v. 493, p. 327-337, 2013.

- Ehninger, D.; Han, S.; Shilyansky, C.; Zhou, Y.; Li, W.; Kwiatkowski, D. J.; Ramesh, V.; Silva, A. J. Reversal of learning deficits in a Tsc2+/- mouse model of tuberous sclerosis. *Nature Medicine*, v. 14, n. 8, p. 843-8, 2008.
- El-Fishawy, P.; State, M. W. The genetics of autism: key issues, recent findings, and clinical implications. *The Psychiatric clinics of North America*, v. 33, n. 1, p. 83-105, 2010.
- Ellingrod, V. L. Perry, P. J.; Lund, B. C.; Bever-Stille, K.; Fleming, F.; Holman, T. L.; Miller, D. 5HT2A and 5HT2C receptor polymorphisms and predicting clinical response to olanzapine in schizophrenia. *Journal of Clinical Psychopharmacology*, v. 22, n. 6, p. 622-4, 2002.
- Erickson, C. A.; Stigler, K. A.; Corkins, M. R.; Posey, D. J.; Fitzgerald, J. F.; McDougle, C. J. Gastrointestinal factors in autistic disorder: a critical review. *Journal of Autism Dev Disord*, v. 35, p. 713-727, 2005.
- Feng, Y.; Zhang, F.; Lokey, L. K.; Chastain, J. L.; Lakkis, L.; Eberhart, D.; Warren, S. T. Translational suppression by trinucleotide repeat expansion at FMR1. *Science*, v. 268, p. 731-734, 1995.
- Findling, R. L.; McNamara, N. K.; Gracious, B. L. O'Riordan, M. A.; Reed, M. D.; Demeter, C.; Blumer, J. L. Quetiapine in nine youths with autistic disorder. *Journal of Child and Adolescent Psychopharmacology*, v. 14, n. 2, p. 287-294, 2004.
- Fombonne, E. Epidemiology of pervasive developmental disorders. *Pediatric Research*, v. 65, p. 591-8, 2009.
- Gallo, G. Semaphorin 3A inhibits ERM protein phosphorylation in growth cone filopodia through inactivation of PI3K. *Developmental Neurobiology*, v. 68, n. 7, p. 926-933, 2008.
- Garber, K.; Smith, K. T.; Reines, D.; Warren, S. T. Transcription, translation and fragile X syndrome. *Current Opinion in Genetics & Development*, v. 16, n. 3, p. 270-275, 2006.
- Garner, C. C.; Tucker, R. P.; Matus, A. Selective localization of messenger RNA for cytoskeletal protein MAP2 in dendrites. *Nature*, v. 6200, p. 674-677, 1988.
- Ghaziuddin, M.; Mountain-Kimchi, K. Defining the intellectual profile of Asperger Syndrome: comparison with high-functioning autism. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, v. 34, n. 3, p. 279-284, 2004.

- Girirajan, S.; Rosenfeld, J. A.; Cooper, G. M.; Antonacci, F.; Siswara, P.; Itsara, A.; Vives, L.; Walsh, T.; McCarthy, S. E.; Baker, C.; Mefford, H. C.; Kidd, J. M.; Browning, S. R.; Browning, B. L.; Dickel, D. E.; Levy, D. L.; Ballif, B. C.; Platky, K.; Farber, D. M.; Gowans, G. C.; Wetherbee, J. J.; Asamoah, A.; Weaver, D. D.; Mark, P. R.; Dickerson, J.; Garg, B. P.; Ellingwood, S. A.; Smith, R.; Banks, V. C.; Smith, W.; McDonald, M. T.; Hoo, J. J.; French, B. N.; Hudson, C.; Johnson, J. P.; Ozmore, J. R.; Moeschler, J. B.; Surti, U.; Escobar, L. F.; El-Khechen, D.; Gorski, J. L.; Kussmann, J.; Salbert, B.; Lacassie, Y.; Biser, A.; McDonald-McGinn, D. M.; Zackai, E. H.; Deardorff, M. A.; Shaikh, T. H.; Haan, E.; Friend, K. L.; Fichera, M.; Romano, C.; Géczy, J.; DeLisi, L. E.; Sebat, J.; King, M. C.; Shaffer, L. G.; Eichler, E. E. A recurrent 16p12.1 microdeletion supports a two-hit model for severe developmental delay. *Nature Genetics*, v. 42, n. 3, p. 203-9, 2010.
- Gkogkas, C. G.; Khoutorsky, A.; Ran, I.; Rampakakis, E.; Nevarko, T.; Weatherill, D. B.; Vasuta, C.; Yee, S.; Truitt, M.; Dallaire, P.; Major, F.; Lasko, P.; Ruggero, D.; Nader, K.; Lacaille, J. C.; Sonenberg, N. Autism-related deficits via dysregulated eIF4E-dependent translational control. *Nature*, v. 493, n. 7432, p. 371-7, 2012.
- Gross, C.; Nakamoto, M.; Yao, X.; Chan, C. B.; Yim, S. Y.; Ye, K.; Warren, S. T.; Bassell, G. J. Excess phosphoinositide 3-kinase subunit synthesis and activity as a novel therapeutic target in fragile X syndrome. *The Journal of Neuroscience*, v. 30, n. 32, p. 10624-10638, 2010.
- Han, J.; Wang, B.; Xiao, Z.; Gao, Y.; Zhao, J.; Chen, B.; Wang, X.; Dai, J. Mammalian target of rapamycin (mTOR) is involved in the neural differentiation of neural progenitors induced by insulin. *Molecular and Cellular Neuroscience*, v. 39, n. 1, p. 118-24, 2008.
- Han, M.; Newell, K.; Zavitsanou, K.; Deng, C.; Huang, X. F. Effects of antipsychotic medication on muscarinic M1 receptor mRNA expression in the rat brain. *Journal of Neuroscience Research*, v. 86, n. 2, o. 457-64, 2008.
- Hantash, F. M.; Goos, D. M.; Crossley, B.; Anderson, B.; Zhang, K.; Sun, W.; Strom, C.M. FMR1 premutation carrier frequency in patients undergoing routine population-based carrier screening: Insights into the prevalence of fragile X syndrome, fragile X-associated tremor/ataxia syndrome, and fragile X-associated primary ovarian insufficiency in the United States. *Genetics in Medicine*, v. 13, n. 1, p. 39-45, 2011.

- Harrington, J. W. The actual prevalence of autism: are we there yet? *Pediatrics*, v. 126, n. 5, p. e1257-8, 2010.
- Hemmerich, K.; Gummersbach, C.; Pallua, N.; Luckhaus, C.; Fehsel, K. Clozapine enhances differentiation of adipocyte progenitor cells. *Molecular Psychiatry*, v. 11, p. 980-983, 2006.
- Herb, A.; Wisden, C.; Catania, M.; Marechal, D.; Dresse, A.; Seeburg, P. Prominent dendritic localization in forebrain neurons of a novel mRNA and its product, dendrin. *Molecular and Cellular Neuroscience*, v. 8, p. 367-374, 1997.
- Herbert, M. R.; Ziegler, D. A.; Makris, N.; Filipek, P. A.; Kemper, T. L.; Normandin, J. J.; Sangers, H. A.; Kennedy, D. N.; Caviness, V. S. Jr. Localization of white matter volume increase in autism and developmental language disorder. *Annals of Neurology*, v. 55, n. 4, p. 530-540, 2004.
- Herbert, M. R. Large brains in autism: the challenge of pervasive abnormality. *The Neuroscientist: a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry*, v. 11, n. 5, p. 417-440, 2005.
- Hoeffler, C. A.; Sanchez, E.; Hagerman, R. J.; Mu, Y.; Nguyen, D. V.; Wong, H.; Whelan, A. M.; Zukin, R. S.; Klann, E.; Tassone, F. Altered mTOR signaling and enhanced CYFIP2 expression levels in subjects with fragile X syndrome. *Genes Brain and Behavior*, v. 11, n. 3, p. 332-41, 2012.
- Hollander, E.; Wasserman, S.; Swanson, E. N.; Chaplin, W.; Schapiro, M. L.; Zagursky, K.; Novotny, S. A double-blind placebo-controlled pilot study of olanzapine in childhood/adolescent pervasive developmental disorder. *Journal of Child and Adolescent Psychopharmacology*, v. 16, n. 5, p. 541-548, 2006.
- Howard, M.; Cowell, P.; Boucher, J.; Broks, P.; Mayes, A.; Farrant, A.; Roberts, N. Convergent neuroanatomical and behavioral evidence of an amygdale hypothesis of autism. *Neuroreport*, v. 11, p. 2931-2935, 2000.
- Huang, J.; Dibble, C. C.; Matsuzaki, M.; Manning, B. D. The TSC1-TSC2 complex is required for proper activation of mTOR complex 2. *Molecular and Cellular Biology*, v. 28, n. 12, p. 4104-4115, 2008.
- Huang, J.; Wu, S.; Wu, C. L.; Manning, B. D. Signaling events downstream of mTOR complex 2 are attenuated in cells and tumors deficient for the tuberous sclerosis complex tumor suppressors. *Cancer Research*, v. 69, n. 15, p. 6107-6114, 2009.

- Huffman, L. C.; Sutcliffe, T. L.; Tanner, I. S.; Feldman, H. M. Management of symptoms in children with autism spectrum disorders: a comprehensive review of pharmacologic and complementary-alternative medicine treatments. *Journal of Developmental and Behavioral Pediatrics*, v. 32, n. 1, p. 56-68, 2011.
- Hunsberger, J.; Austin, D. R.; Henter, I. ; Chen, G. The neurotrophic and neuroprotective effects of psychotropic agents. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, v. 11, n. 3, p. 333-48, 2009.
- Inoki, K.; Ki, Y.; Xu, T.; Guan, K. L. Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling. *Genes & Development* , v. 17, n. 15, p. 1829-34, 2003
- Jamain, S.; Quach, H.; Betancur, C.; Råstam, M.; Colineaux, C.; Gillberg, I. C.; Soderstrom, H.; Giros, B.; Leboyer, M.; Gillberg, C.; Bourgeron, T. & Gillberg, C.; Nydén, A.; Philippe, A.; Cohen, D.; Chabane, N.; Moure-Siméoni, M. C.; Brice, A.; Sponheim, E.; Spurkland, I.; Skjeldal, O. H.; Coleman, M.; Pearl, P. L. Cohen, I.; Tsiouris, J.; Zappella, M.; Menchetti, G.; Pompella, A.; Aschauer, H.; Van Maldergem, L. Mutations of the X-linked genes encoding neuroligins NLGN3 and NLGN4 are associated with autism. *Nature Genetics*, v. 34, n. 1, p. 27-9, 2003.
- Jan, Y. N.; Jan, L. Y. The control of dendrite development. *Neuron*, v. 40, n. 2, p. 229-242, 2003.
- Jaworki, J.; Spangler, S.; Seeburg, D. P.; Hoogenraad, C. C.; Sheng, M. Control of dendritic arborization by the phosphoinositide-3'-kinase-Akt-mammalian target of rapamycin pathway. *Journal of Neuroscience*, v. 25, p. 11300-11312, 2005.
- Jossin, Y.; Goffinet, A. M. Reelin signals through phosphatidylinositol 3-kinase and Akt to control cortical development and through mTor to regulate dendritic growth. *Molecular & Cellular Biology*, v. 27, n. 20, p. 7113-7124, 2007.
- Jung, B. P.; Jugloff, D. G.; Zhang, G.; Logan, R.; Brown, S.; Eubanks, J. H. The expression of methyl CpG binding factor MeCP2 correlates with cellular differentiation in the developing rat brain and in culture cells. *Journal of Neurobiology*, v. 55, n. 1, p. 86-96, 2003.
- Kwiatkowski, D. J.; Manning, B. D. Tuberous sclerosis: a GAP at the crossroads of multiple signaling pathways. *Human Molecular Genetics*, v. 14, p. R251-R258, 2005.
- Kelleher, R. J. III; Bear, M. F. The autistic neuron: troubled translation? *Cell*, v. 135, p. 401-406, 2008.

- Kim, H. G.; Kishikawa, S.; Higgins, A. W.; Seong, I. S.; Donovan, D. J.; Shen, Y.; Lally, E.; Weiss, L. A.; Najm, J.; Kutsche, K.; Descartes, M.; Holt, L.; Braddock, S.; Troxell, R.; Kaplan, L.; Volkmar, F.; Klin, A.; Tsatsanis, K.; Harris, D. J.; Noens, I.; Pauls, D. L.; Daly, M. J.; MacDonald, M. E.; Morton, C. C.; Quade, B. J.; Gusella, J. F. Disruption of neurexin 1 associated with autism spectrum disorder. *American Journal of Human Genetics*, v. 82, n. 1, p. 199-207, 2008.
- Kindler, S.; Rehbein, M.; Classen, B.; Richter, D.; Böckers, T. M. Distinct spatiotemporal expression of SAPAP transcripts in the developing rat brain: a novel dendritically localized mRNA. *Brain Research: Molecular Brain Research*, v. 1, p. 14-21, 2004.
- Kindler, S.; Dieterich, D. C.; Schutt, J.; Sahin, J.; Karpova, A.; Mikhaylova, M.; Schob, C.; Gundelfinger, E. D.; Kreienkamp, H. J.; Kreutz, M. R. Dendritic mRNA targeting of Jacob and N-methyl-d-aspartate-induced nuclear translocation after campain-mediated proteolysis. *Journal of Biological Chemistry*, v. 37, p. 25431-25440, 2009.
- Kraegen, E. W.; James, D. E.; Jenkins, A. B.; Chisholm, D. J. Dose-response curves for in vivo insulin sensitivity in individual tissues in rats. *American Journal of Physiology*, v. 248, n. 3, p. E353-E362. 1985.
- Kumar, V.; Zhang, M. X.; Swank, M. W.; Kunz, J.; Wu, G. Y. Regulation of dendritic morphogenesis by Ras-PI3K-Akt-mTOR and Ras-MAPK signaling pathways. *The Journal of Neuroscience*, v. 25, n. 49, p. 11288-11299, 2005.
- Kusenda, M.; Sebat, J. The role of rare structural variants in the genetics of autism spectrum disorders. *Cytogenetic and genome research*. v. 123, p. 36-43, 2008.
- Krueger, D. D.; Bear, M. F. Toward fulfilling the promise of molecular medicine in fragile X syndrome. *Annual Review of Medicine*, v. 62, p. 411-29, 2011.
- Le Belle, J. E.; Orozco, N. M.; Paucar, A. A.; Saxe, J. P.; Mottahedeh, J.; Pyle, A. D.; Wu, H.; Kornblum, H. I. Proliferative neural stem cells have high endogenous ROS levels that regulate self-renewal and neurogenesis in a PI3K/Akt-dependent manner. *Cell*, v. 8, p. 59-71, 2011.
- Levy, S. E.; Mandell, D. S.; Schultz, R. T. Autism. *Lancet*, v. 374, p. 1627-1638, 2009.
- Li, Y. H.; Werner, H.; Puschel, A. W. Rheb and mTOR regulate neuronal polarity through Rap1B. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 283, n. 48, p. 33784-33792, 2008.

- Link, W.; Konietzko, U.; Kauselmann, G.; Krug, M.; Schwanke, B.; Frey, U.; Kuhl, D. Somatodendritic expression of an immediate early gene is regulated by synaptic activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 12, p. 5734-5738, 1995.
- Lyford, G. L.; Yamagata, K.; Kaufmann, W. E.; Barnes, C. A.; Sanders, L. K.; Copeland, N. G.; Gilbert, D. J.; Jenkins, N. A.; Lanahan, A. A.; Worley, P. F. Arc, a growth factor and activity-regulated gene, encodes a novel cytoskeleton-associated protein that is enriched in neuronal dendrites. *Neuron*, v.2, p. 433-445, 1995.
- Maehama, T.; Dixon, J. E. The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second Messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 273, n. 22, p. 13375-8, 1998.
- Maenner, M. J.; Durkin, M. S. Trends in the prevalence of autism on the basis of special education data. *Pediatrics*, v. 126, p. e1018-25, 2010.
- Matsui-Sakada, A.; Ohtani, H.; Sawada, Y. Receptor occupancy-based analysis of the contributions of various receptors to antipsychotics-induced weight gain and diabetes mellitus. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, v. 20, n. 5, p. 368-78, 2005.
- Mattila, M. L.; Hurtig, T.; Haapsamo, H.; Jussila, K.; Kuusikko-Gauffin, S.; Kielinen, M.; et al. Comorbid psychiatric disorders associated with Asperger syndrome/high-functioning autism: a community- and clinic-based study. *Journal of Autism Dev Disord*, v. 40, p. 1080-1093, 2010.
- Meikle, L.; Pollizzi, K.; Egnor, A.; Krawvis, I.; Lane, H.; Sahin, M.; Kwiatkowski, D. J. Response of a neuronal model of tuberous sclerosis to mTOR inhibitors: effects on mTORC1 and Akt signaling lead to improved survival and function. *Journal of Neuroscience*, v. 28, n. 21, p. 5422-5432, 2008.
- Ménager, C.; Arimura, N.; Fukata, Y.; Kaibuchi, K. PIP3 is involved in neuronal polarization and axon formation. *Journal of Neurochemistry*, v. 89, n. 1, p. 109-118, 2004.
- Miles, J. H. Autism spectrum disorders – A genetics review. *Genetics in Medicine*, v. 13, n. 4, p. 278-294, 2011.

- Minet-Ringuet, J.; Even, P. C.; Valet, P.; Carpéné, C.; Visentin, V.; Prévot, D.; Daviaud, D.; Quignard-Boulange, A.; Tomé, D.; de Beaurepaire, R. Alterations of lipid metabolism and gene expression in rat adipocytes during chronic olanzapine treatment. *Molecular Psychiatry*, v. 12, n. 6, p. 562-71, 2007.
- Molloy, C. A.; Keddache, M.; Martin, L. J. Evidence for linkage on 21q and 7q in subset of autism characterized by developmental regression. *Molecular Psychiatry*, v. 10, n. 8, p. 741-6, 2005.
- Muhle, R.; Trentacoste, S. V.; Rapin, I. The genetics of autism. *Pediatrics*, v. 113, n. 5, p. e472-86, 2004.
- Nan, X.; Ng, H. H.; Johnson, C. A.; Laherty, C. D.; Turner, B. M.; Eisenman, R. N.; Bird, A. Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature*, v. 393, p. 386-389, 1998.
- Nazeer, A. Psychopharmacology of autistic spectrum disorders in children and adolescents. *Pediatric Clinics of North America*, v. 58, n. 1, p. 85-97, 2011.
- Nelen, M. R.; Kremer, H.; Konings, I. B.; Schoute, F.; van Essen, A. J.; Koch, R.; Woods, C. G.; Fryns, J. P.; Hamel, B.; Hoefsloot, L. H.; Peeters, E. A.; Padberg, G. W. Novel PTEN mutations in patients with Cowden disease: absence of clear genotype-phenotype correlations. *European Journal of Human Genetics*, v. 7, n. 3, p. 267-273, 1999.
- Neves-Pereira, M.; Müller, B.; Massie, D.; Williams, J. H. G.; O'Brien, P. C. M.; Hughes, A.; Shen, S. B.; St Clair, D.; Miedzybrodzka, Z. Deregulation of *EIF4E*: a novel mechanism for autism. *Journal of Medical Genetics*, v. 46, p. 759-765, 2009.
- Newcomer, J. W. Metabolic considerations in the use of antipsychotic medications: a review of recent evidence. *The Journal of Clinical Psychiatry*, v. 68(Suppl 1), p. 20-7, 2007.
- Noriuchi, M.; Kikuchi, Y.; Yoshiura, T.; Kira, R.; Shigeto, H.; Hara, T.; Tobimatsu, S.; Kamio, Y. Altered white matter fractional anisotropy and social impairment in children with autism spectrum disorder. *Brain Research*, v. 1362, p. 141-9, 2010.
- Opgen-Rhein, C.; Brandl, E. J.; Müller, D. J.; Neuhaus, A. H.; Tiwari, A. K.; Sander, T.; Dettling, M. Association of HTR2C, but not LEP or INSIG2, genes with antipsychotic-induced weight gain in a German sample. *Pharmacogenomics*, v. 11, n. 6, p. 773-80, 2010.

- Otaegi, G.; Yista-Boyo, M. J.; Vergaño-Vera, E.; Méndez-Gómez, H. R.; Carrera, A. C.; Abad, J. L.; Gonzáles, M.; de La Rosa, E. J.; Vicario-Abejón, C.; de Pablo, F. Modulation of the PI3-kinase-Akt signaling pathway by IGF-1 and PTEN regulates the differentiation of neural stem/precursor cells. *Journal of Cell Science*, v. 119(Pt 13), p. 2739-48, 2006.
- Parikh, M. S.; Kolevzon, A.; Hollander, E. Psychopharmacology of aggression in children and adolescents with autism: a critical review of efficacy and tolerability. *J Child Adolesc Psychopharmacol*, v. 18, p. 157-178, 2008.
- Pavan, C.; Vindigni, V.; Michelotto, L.; Rimessi, A.; Abatangelo, G.; Cortivo, R.; Pinton, P.; Zavan, B. Weight gain related to treatment with atypical antipsychotics is due to activation of PKC-beta. *The Pharmacogenomics Journal*, v. 10, n. 5, p. 408-17, 2009.
- Peltier, J.; O'Neill, A.; Schaffer, D. V. PI3K/Akt and CREB regulate adult neural hippocampal progenitor proliferation and differentiation. *Developmental Neurobiology*, v. 67, n. 10, p. 1348-61, 2007.
- Penzes, P.; Cahill M. E.; Jones, K. A.; VanLeeuwen, J. E.; Woolfrey, K. M. Dendritic spine pathology in neuropsychiatric disorders. *Nature Neuroscience*, v. 14, n. 3, p. 285-293, 2011.
- Persico, A. M.; D'Agruma, L.; Mariorano, N.; Totaro, A.; Militeri, R.; Bravaccio, C.; Wassink, T. H.; Schneider, C.; Melmed, R.; Trillo, S.; Montecchi, F.; Palermo, M.; Pascucci, T.; Puglisi-Allegra, S.; Reichelt, K. L.; Conciatori, M.; Marino, R.; Quattrocchi, C. C.; Baldi, A.; Zelante, L.; Gasparini, P.; Keller, F. Reelin gene alleles and haplotypes as a factor predisposing to autistic disorder. *Molecular Psychiatry*, v. 6, p. 150-159, 2001.
- Pfaffl, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, v. 29, n. 9, e45, 2001.
- Posey, D. J.; Stigler, K. A.; Erickson, C. A.; McDougle, C. J. Antipsychotics in the treatment of autism. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 118, n. 1, p. 6-14, 2008.
- Redcay, E.; Courchesne, E. When is the brain enlarged in autism? A meta-analysis of all brain size reports. *Biological Psychiatry*, v. 58, n. 1, p. 1-9, 2005.
- Research Units on Pediatric Psychopharmacology Autism Network Autism Network, Risperidone treatment of autistic disorder: longer-term benefits and blinded

- discontinuation after 6 months. *American Journal of Psychiatry*, v. 162, n. 7, p. 1361-1369, 2005.
- Reynolds, G. P.; Zhang, Z. J.; Zhang, X. B. Association of antipsychotic drug-induced weight gain with a 5-HT_{2C} receptor gene polymorphism. *Lancet*, v. 359, n. 9323, p. 2086-7, 2002.
- Ricciardi, S.; Boggio, E. M.; Grosso, S.; Lonetti, G.; Forlani, G.; Stefanelli, G.; Calcagno, E.; Morello, N.; Landsberger, N.; Biffo, S.; Pizzorusso, T.; Giustetto, M.; Broccoli, V. Reduced AKT/mTOR signaling and protein synthesis dysregulation in a Rett syndrome animal model. *Human Molecular Genetics*, v. 20, n. 6, p. 1182-1196, 2011.
- Sakai, Y.; Shaw, C. A.; Dawson, B. C.; Dugas, D. V.; Al-Mohtaseb, Z.; Hill, D. E.; Zoghbi, H. Y. Protein interactome reveals converging molecular pathways amos autism disorders. *Science Translational Medicine*, v. 3, n. 86, p. 86ra49, 2011.
- Schumann, C. M.; Hamstra, J.; Goodlin-Jones, B. L.; Lotspeich, L. J.; Kwon, H.; Buonocore, M. H.; Lammers, C. R.; Reiss, A. L.; Amaral, D. G. The amygdale is enlarged in children but not adolescents with autism; the hippocampus is enlarged at all ages. *The Journal of Neuroscience*, v. 24, n. 28, p. 6392-401, 2004.
- Sharma, A.; Hoeffler, C. A.; Takayasu, Y.; Miyawaki, T.; McBride, S. M.; Klann, E.; Zukin, R. S. Dysregulation of mTOR signaling in fragile X syndrome. *The Journal of Neuroscience*, v. 30, n. 2, p. 694-702, 2010.
- Shi, S. H.; Jan, J. Y.; Jan, Y. N. Hippocampal neuronal polarity specified by spatially localized mPar3/mPar6 and PI3-kinase activity. *Cell*, v. 112, p. 63-75, 2003.
- Simonoff, E.; Pickles, A.; Charman, T.; Chandler, S.; Loucas, T.; Baird, G. Psychiatric disorders in children with autism spectrum disorders: prevalence, comorbidity, and associated factors in a population-derived sample. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, v. 47, p. 921-929, 2008.
- Spalding, K. L.; Arner, E.; Westermarck, P. O.; Bernard, S.; Buchholz, B. A.; Bergmann, O.; Blomqvist, L.; Hoffstedt, J.; Näslund, E.; Britton, T.; Concha, H.; Hassan, M.; Rydén, M.; Frisén, J.; Arner, P. Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature*, v. 453, n. 7196, p. 783-787, 2008.

- Sparks, B.; Friedman, S.; Shaw, S.; Aylward, E.; Dager, S. et al. Brain structural abnormalities in young children with autism spectrum disorder. *Neurology*, v. 59, p. 184-192, 2002.
- Steward, O.; Schuman, E. M. Compartmentalized synthesis and degradation of protein in neurons. *Neuron*, v. 40, p. 347-359, 2003.
- Stigler, K. A.; Potenza, M. N.; Posey, D. J.; McDougale, C. J. Weight gain associated with atypical antipsychotic use in children and adolescents: prevalence, clinical relevance, and management. *Pediatric Drugs*, v. 6, n. 1, p. 33-44, 2004.
- Stigler, K. A.; Diener, J. T.; Kohn, A. E.; Erickson, C. A.; Posey, D. J.; McDougale, C. J. A prospective, open-label study of aripiprazole in youth with Asperger's disorder and pervasive developmental disorder not otherwise specified. *Neuropsychopharmacology*, v. 31, p. S194, 2006.
- Tang, S. J.; Reis, G.; Kang, H.; Gingras, A. C.; Sonenber, N.; Schuman, E. M. A rapamycin-sensitive signaling pathway contributes to long-term synaptic plasticity in the hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, v. 99, n. 1, p. 467-472, 2002.
- Tsai, P. T.; Hull, C.; Chu, Y.; Greene-Colozzi, E.; Sadowski, A. R.; Leech, J. M.; Steinberg, J.; Crawley, J. N.; Regehr, W. G.; Sahim, M. Autistic-like behavior and cerebellar dysfunction in Purkinje cell Tsc1 mutant mice. *Nature*, v. 488, n. 7413, p. 647-51, 2012.
- Tucker, K. L. Neurotrophins and the control of axonal outgrowth. *Panminerva Medica*, v. 44, n. 4, p. 325-333, 2002.
- Turner, G.; Robinson, H.; Laing, S.; van den Berk, M.; Colley, A.; Goddard, A.; Sherman, S.; Partington, M. Population screening for fragile X. *Lancet*, v. 339, n. 8803, p. 1210-3, 1992.
- Vestri, H. S.; Maianu, L.; Moellering, D. R.; Garvey, W. T. Atypical antipsychotic drugs directly impair insulin action in adipocytes: effects on glucose transport, lipogenesis, and antilipolysis. *Neuropsychopharmacology*, v. 32, n. 4, p. 765-72, 2006.
- Vodrazka, P.; Korostylev, A.; Hirschberg, A.; Swiercz, J. M.; Worzfeld, T.; Deng, S.; Fazzari, P.; Tamagnone, L.; Offermanns, S.; Kuner, R. The semaphoring 4D-plexin-B signaling complex regulates dendritic and axonal complexity in developing neurons via diverse pathways. *European Journal of Neuroscience*, v. 30, p. 1193-1208, 2009.

- Vorstman, J. A.; Staal, W. G.; van Daalen, E.; van Engeland, H.; Hochstenbach, P. F.; Franke, L. Identification of novel autism candidate regions through analysis of reported cytogenetic abnormalities associated with autism. *Molecular Psychiatry*, v. 11, p. 18-28, 2006.
- Welch, J. M.; Wang, D.; Feng, G. Differential mRNA expression and protein localization of the SAP90/PSD-95-associated proteins (SAPAPs) in the nervous system of the mouse. *The Journal of Comparative Neurology*, v. 1, p. 24-39, 2004.
- Witwer, A.; Lecavalier, L. Treatment incidence and patterns in children and adolescents with autism spectrum disorders. *Journal of Child and Adolescent Psychopharmacology*, v. 15, n. 4, p. 671-681, 2005.
- Xu, L. M.; Li, J. R.; Huang, Y.; Zhao, M.; Tang, X.; Wei, L. AutismKB: and evidence-based knowledgebase of autism genetics. *Nucleic Acids Research*, v. 40, p. D1016-1022, 2012.
- Zhao, X.; Leotta, A.; Kustanovich, V.; Lajonchere, C.; Geschwind, D. H.; Law, K.; Law, P.; Qiu, S.; Lord, C.; Sebat, J.; Ye, K.; Wingler, M. A unified genetic theory for sporadic and inherited autism. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, v. 104, n. 31, p. 12831-6, 2007.
- Zhou, F. Q.; Zhou, J.; Dedhar, S.; Wu, Y. H.; Snider, W. D. NGF-induced axon growth is mediated by localized inactivation of GSK-3 β and functions of the microtubule plus end binding protein APC. *Neuron*, v. 42, p. 897-912, 2004.
- Zhou, J.; Blundell, J.; Ogawa, S.; Kwon, C. H.; Zhang, W.; Sinton, C.; Powell, C. M.; Parada, L. F. Pharmacological inhibition of mTORC1 suppresses anatomical, cellular, and behavioral abnormalities in neural-specific *Pten* knock-out mice. *The Journal of Neuroscience*, v. 29, n. 6, p. 1773-1783, 2009.
- Zuk, P. A.; Zhu, M.; Mizuno, H.; Huang, J.; Futrell, J. W.; Katz, A. J.; Benhaim, P.; Lorenz, H. P.; Hedrick, M. H. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Engineering*, v. 7, n. 2, p. 211-28, 2001.