

INTRODUÇÃO

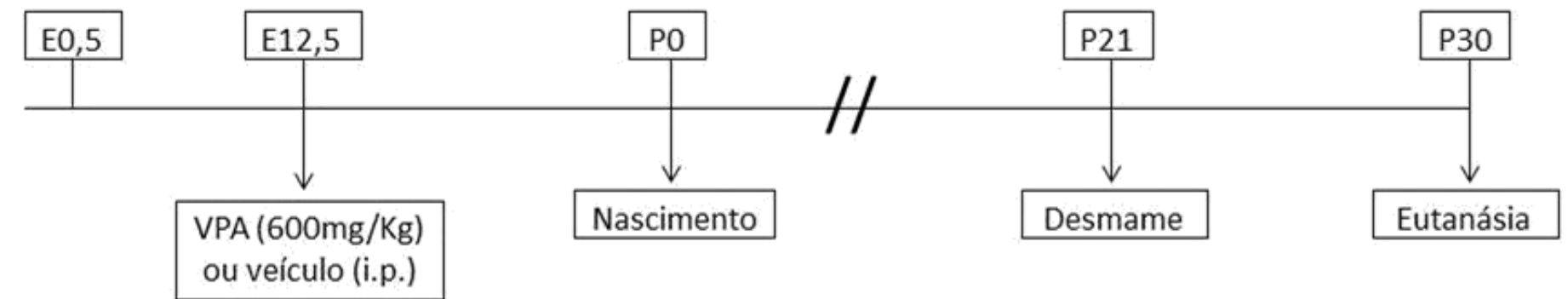
O Transtorno do Espectro Autista (TEA) é caracterizado por dificuldades na comunicação social e por repertório restrito de atividades e interesses. A etiologia do TEA continua desconhecida, e o diagnóstico atualmente é baseado em características comportamentais, sem biomarcadores disponíveis. A exposição pré-natal ao ácido valproico (VPA) durante o desenvolvimento embrionário aumenta o risco de se desenvolver TEA. Portanto, o VPA é usado para induzir um modelo animal de TEA. MicroRNA (miRNA) são pequenos RNA não-codificantes com 19-25 nucleotídeos que agem como reguladores da expressão gênica e no controle de muitos processos biológicos. Níveis alterados de expressão de miRNA podem estar relacionados a características de TEA e podem gerar novos *insights* na busca por marcadores moleculares para kits diagnósticos.

OBJETIVOS

Avaliar e comparar os níveis de expressão de miRNA em amostras de sangue de: (1) modelo animal de TEA induzido por exposição pré-natal ao VPA, e; (2) sujeitos autistas.

MÉTODOS

O modelo animal foi obtido com uma injeção intraperitoneal única de VPA (600 mg/kg) no dia gestacional 12,5, enquanto o grupo controle recebeu solução salina. O sangue periférico foi coletado de filhotes machos com 30 dias de vida, como a linha experimental abaixo ilustra:



As amostras de sangue periférico dos sujeitos autistas e do grupo controle (5-15 anos de idade) foram obtidas no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). O RNA total foi, então, extraído. A expressão relativa de miRNA Maduro foi avaliada pela transcriptase reversa, seguida por PCR quantitativo (RT-qPCR) usando o método $-\Delta\Delta C_t$, considerando a eficiência do RT-qPCR e os valores do $-\Delta\Delta C_t$ para cada miRNA. O algoritmo geNorm foi empregado para identificar normalizadores dos miRNA entre dez miRNA avaliados. A análise estatística foi feita por meio do teste T de Student, com $p < 0.05$ considerado significativo. Este trabalho foi aprovado pelo comitê de ética (código 30452) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os sujeitos autistas apresentaram aumento significativo de níveis de miR-138 e miR-134, quando comparados com o grupo controle (Fig. 1). Interessantemente, miR-134 também estava aumentado no sangue do modelo VPA (Fig. 2), mostrando que as mudanças induzidas por VPA nos níveis de miRNA podem ser correlacionadas aos achados em sujeitos autistas. Por conseguinte, a avaliação do perfil de expressão dos níveis de miRNA podem ser útil como possíveis biomarcadores para futuras ferramentas diagnósticas.

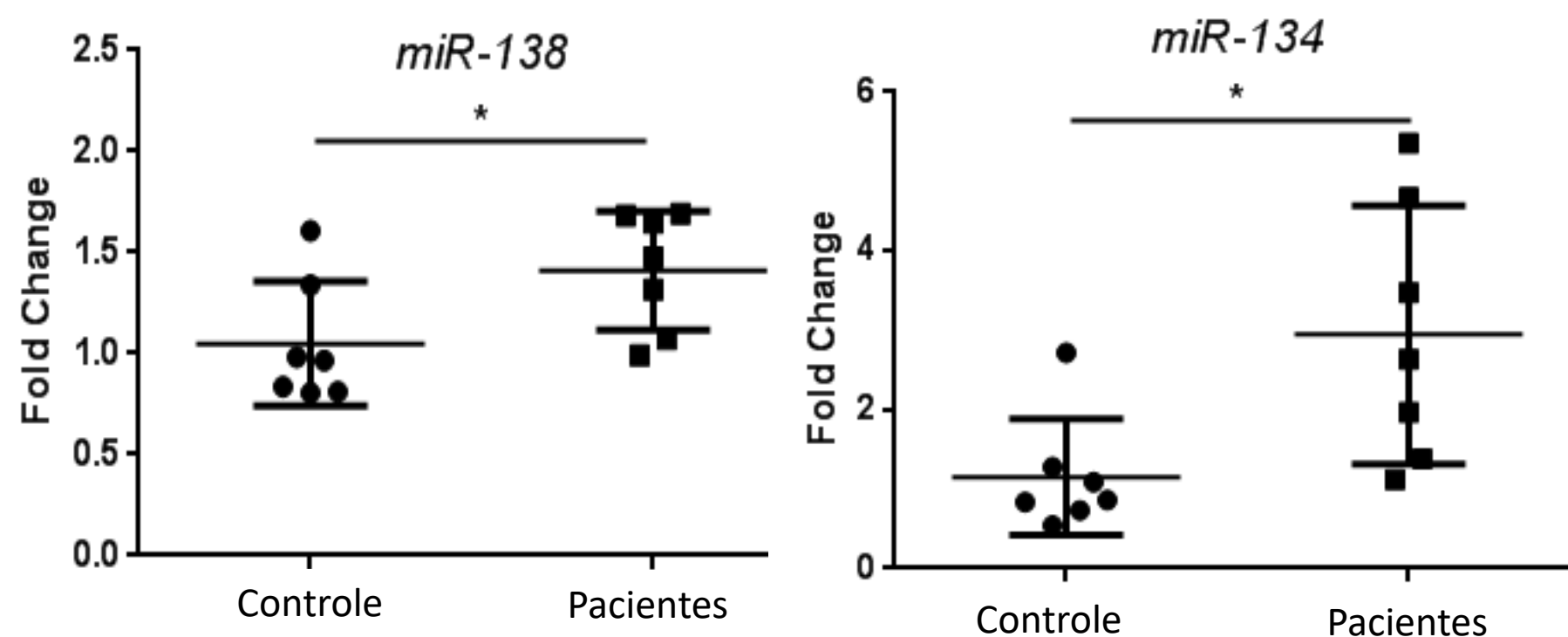


Figura 1. Expressão relativa de miR-138 e miR-134 em sangue periférico de crianças com TEA comparado ao grupo controle. Resultados expressos como média \pm erro padrão. Análise por teste T; * $p < 0,05$.

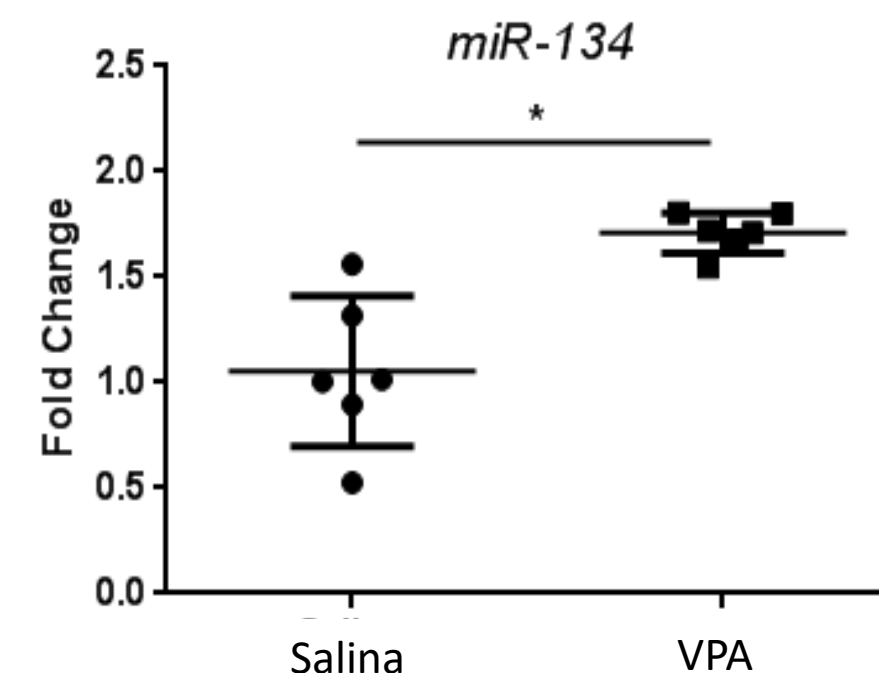


Figura 2. Expressão relativa de miR-134 em sangue periférico de ratos de 30 dias pré-natalmente expostos ao VPA comparado ao grupo controle. Resultados expressos como média \pm erro padrão. Análise por teste T; * $p < 0,05$.

Duas vias antagonísticas estão envolvidas na regulação da actina do citoesqueleto nos espinhos dendríticos. Curiosamente, foi demonstrado que o miR-138 regula negativamente o crescimento de espinhos dendríticos, tendo como alvo a proteína Acil tioesterase 1 (Apt1) e então ativa a cascata RhoA–Rock, a qual leva ao encolhimento do espinho. Além disso, o miR-134 inibe a produção de Limk1, reduzindo, com isso, a polimerização da actina filamentosa e o crescimento dendrítico (Fig. 3).

Portanto, nossos resultados indicaram que a avaliação do perfil de expressão de miRNA pode ser usada para realizar investigações mecanísticas das vias de sinalização supostamente alteradas no TEA, como a formação e maturação sinápticas. Estudos recentes demonstraram que os miRNA podem alcançar a corrente sanguínea, tornando razoável pressupor que mudanças nos níveis séricos de miRNA reflitam possíveis alterações em tecidos neurais. Como amostras de sangue podem ser prontamente obtidas de maneira minimamente invasivo, o miRNA sérico pode se tornar uma ferramenta valiosa como biomarcador de diversas desordens, incluindo TEA.

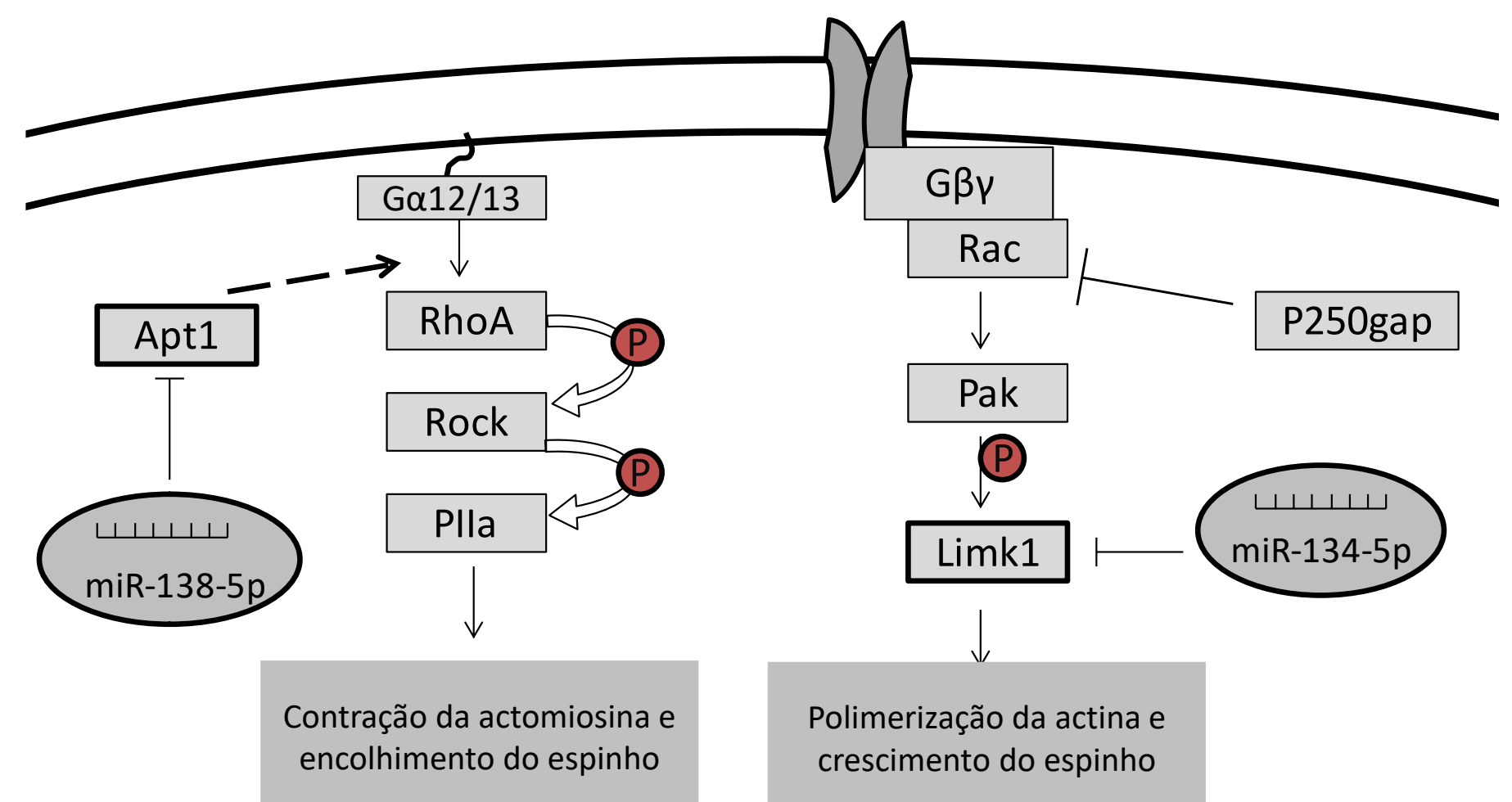


Figura 3. Controle do tamanho do espinho dendrítico dependente de miRNA. O citoesqueleto de actina dentro de dendritos e espinhos é dinamicamente regulado por duas vias antagonísticas, a cascata RhoA–ROCK e a sinalização Rac–LIMK1.

CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

A avaliação do miRNA sérico pode ser útil como possível biomarcador e como meio para o estudo de processos biológicos alterados no TEA, uma vez que amostras de tecido são pouco acessíveis, o que dificulta a investigação dos níveis de miRNA em tecidos vivos. Entretanto, estudos adicionais avaliando os níveis de miRNA em tecidos neurais são necessários a fim de esclarecer os papéis do miRNA na etiologia do TEA. Para um cenário mais elaborado, é importante que se expanda o estudo para mais miRNA e para o entendimento de sua influência em diversas vias para identificar os componentes implicados no mecanismo de ação do VPA.

REFERÊNCIAS

- Bambini-Junior V. et al. *Brain Research*. 2011, 1408(0):8-16.
- Schneider, T. et al. *Neuropsychopharmacology*,. 2005. 30, pp. 80–89
- Ambros V. *Nature* 2004, 431(7006):350-355.
- Bartel, D.P., *Cell*. 2009. 136, 215-233
- Schratt, G.M. et al. *Nature*. 2006. 439, 283-9.
- Chen, C. et al.. *Nucleic Acids Research*, 2005. 33, pp. e179-e179.
- Herz and Chen. *Nature Reviews Neuroscience* 2006. 7,:850–859
- Levy et al, *Front. Neuroanat*. 2014. 8:16

Agradecimentos

CAPES, CNPq, PROPESQ-UFRGS, FIPE-HCPA, INCT-NIM.