



Evento	XXI FEIRA DE INICIAÇÃO À INOVAÇÃO E AO DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO – FINOVA/2012
Ano	2012
Local	Porto Alegre - RS
Título	Perfil da expressão de microRNA no autismo clássico: perspectivas de aplicação no diagnóstico e no estudo da etiologia
Autores	GABRIELA MUELLER DE MELO Tamara da Silva Vaccaro JULIA MEDEIROS SORRENTINO CLAUDIA MARLISE BALBINOTTI ANDRADE Socrates Salvador RUDIMAR DOS SANTOS RIESGO ROGERIO MARGIS CARMEM JURACY SILVEIRA GOTTFRIED
Orientador	CARMEM JURACY SILVEIRA GOTTFRIED

Perfil da expressão de microRNA no autismo clássico: perspectivas de aplicação no diagnóstico e no estudo da etiologia

Gabriela Mueller de Melo^{1,2}, Tamara Vaccaro^{1,2}, Julia Sorrentino^{1,2}, Cláudia Andrade³, Sócrates Salvador^{2,4}, Rudimar Riesgo^{2,4}, Rogério Margis⁴, Carmem Gottfried^{1,2}

¹Grupo de Pesquisa em Plasticidade Neuroglial, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Bioquímica, ICBS - UFRGS;

²Grupo de Estudo Translacional do Espectro do Autismo (GETEA);

³Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular - Centro de Biotecnologia - UFRGS;

⁴Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, Faculdade de Medicina-UFRGS.

Os Transtornos do Espectro do Autismo (TEA), também denominado simplesmente de autismo, têm atraído crescente atenção pública devido à sua alta prevalência, elevado custo econômico e social e grande impacto aos familiares. De acordo com o texto revisado do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-TR), o autismo é dividido em autismo clássico, autismo não especificado e síndrome de Asperger. Estudos epidemiológicos recentes nos Estados Unidos da América revelam a prevalência de um diagnóstico de TEA para cada 88 crianças com desenvolvimento típico. Apesar da grande variabilidade no quadro clínico, esses transtornos comprometem o desenvolvimento através de três manifestações principais: alterações qualitativas na interação social, alterações nas habilidades de comunicação e presença de comportamentos e interesses estereotipados e repetitivos.

O autismo foi descrito pela primeira vez em 1943, pelo médico psiquiatra Leo Kanner, e desde então se tem ampliado o número de estudos sobre o TEA. Apesar disso, ainda não se conhece a etiologia e sua base molecular está superficialmente compreendida. Mesmo depois de estabelecidas diversas evidências de alterações neurológicas, genéticas e imunológicas relacionadas ao transtorno, ainda não existe um marcador biológico definido. É justamente a ausência desse marcador que torna muito difícil o estabelecimento de um diagnóstico precoce. Como consequência, o início do tratamento frequentemente é tardio, considerando que as primeiras manifestações dos sintomas podem ser percebidas somente ao redor de três anos de idade, concomitantemente com a possibilidade de realizar o diagnóstico.

Estudos epidemiológicos demonstram que para o desenvolvimento do autismo, além da predisposição genética, é necessária a interação com fatores ambientais. Assim, o autismo é caracterizado como um transtorno multifatorial, sendo que alterações epigenéticas possivelmente estão relacionadas ao seu desencadeamento. Nesse sentido é possível, por exemplo, detectar padrões diferenciais de expressão de microRNA (miR) e do conteúdo de DNA nuclear no autismo.

Os miR são sequências de aproximadamente 22 nucleotídeos de RNA dupla fita não-codificante. Eles atuam na regulação da expressão de genes específicos, geralmente inibindo a produção proteica por afetar a tradução e/ou estabilidade do RNA mensageiro (RNAm) alvo. Essas moléculas desempenham importantes papéis biológicos, estando associadas a muitas funções do ciclo celular, expressão gênica neuronal e perfil sináptico. Padrões alterados de expressão de miR têm sido correlacionados com várias patologias de natureza multifatorial, incluindo o autismo.

O outro fator analisado, o DNA nuclear, consiste no conteúdo de DNA livre circulante no sangue. A sua quantificação no soro é utilizada para avaliar morte celular, que é proporcional à quantidade de DNA circulante. Em situações de dano celular, quadros de doenças como o câncer e durante processos inflamatórios há um aumento de DNA nuclear circulante.

Fundamentado nessas informações, os principais objetivos do presente trabalho, exercido pelo grupo de pesquisa que participo, foram a quantificação e comparação do padrão de expressão de 26 miR, em 8 crianças com autismo clássico e 5 crianças com desenvolvimento típico, e a quantificação e comparação do DNA nuclear em 19 crianças com autismo clássico e 17 crianças com desenvolvimento típico. Ambos os experimentos foram feitos através da técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em tempo real, através do sistema SYBR Green®.

Para os miR, a análise estatística aplicada foi o Teste T para amostras independentes, considerado significativo para $p < 0,05$. Verificou-se que 6 miR apresentaram expressão alterada nos pacientes com autismo em relação ao grupo controle. Um deles é o miR-34c, que mostrou expressão relativa aumentada nos pacientes com autismo. O miR-34c apresenta atividade anti-proliferativa não associada com apoptose, sendo capaz de induzir a parada do desenvolvimento celular quando super-expressado. Esse miR atua na inibição do RNAm da proteína c-myc, que é o seu principal alvo. A c-myc está relacionada com inúmeros mecanismos celulares, dentre eles proliferação, diferenciação, renovação, metabolismo e ciclo celular, apoptose e angiogênese. A expressão do gene C-MYC é indispensável durante o desenvolvimento embrionário normal, e a sua desregulação é um dos principais fatores relacionados a alterações em funções celulares.

Foi observada a redução da concentração de DNA nuclear no soro dos pacientes com autismo. Nesse transtorno, o possível bloqueio da proteína c-myc pela expressão aumentada do miR-34c reduziria a proliferação e a atividade celular, mas aumentaria os níveis de sobrevivência. Com as células morrendo menos, ocorreria um aumento no seu número e uma redução do DNA nuclear circulante. Isso poderia justificar o maior número de células encontrado em algumas regiões encefálicas dos pacientes com autismo, como o córtex pré-frontal e amígdala.

Esses resultados são bastante promissores para os avanços nos estudos dos mecanismos envolvidos no autismo. Uma próspera perspectiva de aplicação dos mesmos está no desenvolvimento de exames diagnósticos e tratamentos mais específicos para esse transtorno. Nesse sentido, o conjunto dos 6 miR que estão alterados pode ser usado como ferramenta para contribuir com o diagnóstico.

Este projeto, portanto, é inovador e tecnológico, pois pode resultar na elaboração de um kit de diagnóstico precoce, visto que ainda não se tem marcador clínico específico para o autismo. Inclusive já existe interesse empresarial no desenvolvimento do kit, caso o mesmo seja validado. Assim, além de contribuir para o diagnóstico precoce, esses miR alterados podem servir como pistas para a compreensão da etiologia. Em função disso, novos estudos serão desenvolvidos no laboratório para ampliar o número amostral e buscar os alvos dos miR estudados.

Apoio financeiro: CNPq, CAPES, PROPESq/UFRGS, FIPE/HCPA, IBN-NET.