

Mais uma possível causa do autismo

Inflamação reduz conexões de neurônios obtidos em laboratório a partir de células do dente de crianças com o transtorno neurológico

Diego Freire

Dentes de leite que chegam ao laboratório dos pesquisadores do projeto “A fada do dente”, na Universidade de São Paulo (USP), estão ajudando a conhecer melhor as alterações que podem ocorrer no cérebro em algumas formas de autismo, um conjunto de distúrbios de origem neurológica que se manifestam na infância e podem prejudicar, em maior ou menor grau, as capacidades cognitivas, de comunicação e de interação social, além da habilidade motora. De causas ainda pouco conhecidas, o autismo – ou os transtornos do espectro do autismo, como preferem os especialistas – inclui quadros tão variados quanto o autismo clássico, marcado por dificuldades severas de linguagem e de interação social, ou a síndrome de Asperger, na qual a inteli-

gência é normal ou superior à média e a aquisição da linguagem se dá sem problemas, mas são comuns os gestos repetitivos e a falta de controle em movimentos delicados. Esses transtornos atingem cerca de 1% das crianças na Inglaterra e nos Estados Unidos – não há estudos detalhados sobre sua frequência no Brasil – e são quatro vezes mais comuns entre meninos do que entre meninas.

A partir de dentes de leite doados por crianças com e sem autismo, os grupos liderados pelos neurocientistas brasileiros Patricia Beltrão Braga, da USP, e Alysson R. Muotri, da Universidade da Califórnia em San Diego, nos Estados Unidos, confirmaram que uma inflamação em células cerebrais chamadas astrócitos pode estar associada ao desenvolvimento de uma forma grave desse transtorno. Mais importante: ao menos em laboratório, o controle da inflamação nos astrócitos reverteu alterações que ela provoca nos neurônios, as células responsáveis por transmitir e armazenar informações no cérebro e que se encontram mais imaturas nessa forma de autismo.

Como seria arriscado e antiético extrair as células do cérebro das crianças, os pesquisadores se valeram de uma alternativa engenhosa para recriá-las em laboratório. Eles recuperaram algumas células do interior de dentes que caem naturalmente na infância e usaram compostos químicos para fazê-las regressar a um estado mais versátil, a partir do





qual poderiam gerar outros tipos celulares. Em seguida, adicionaram compostos que as estimularam a se transformar em células cerebrais.

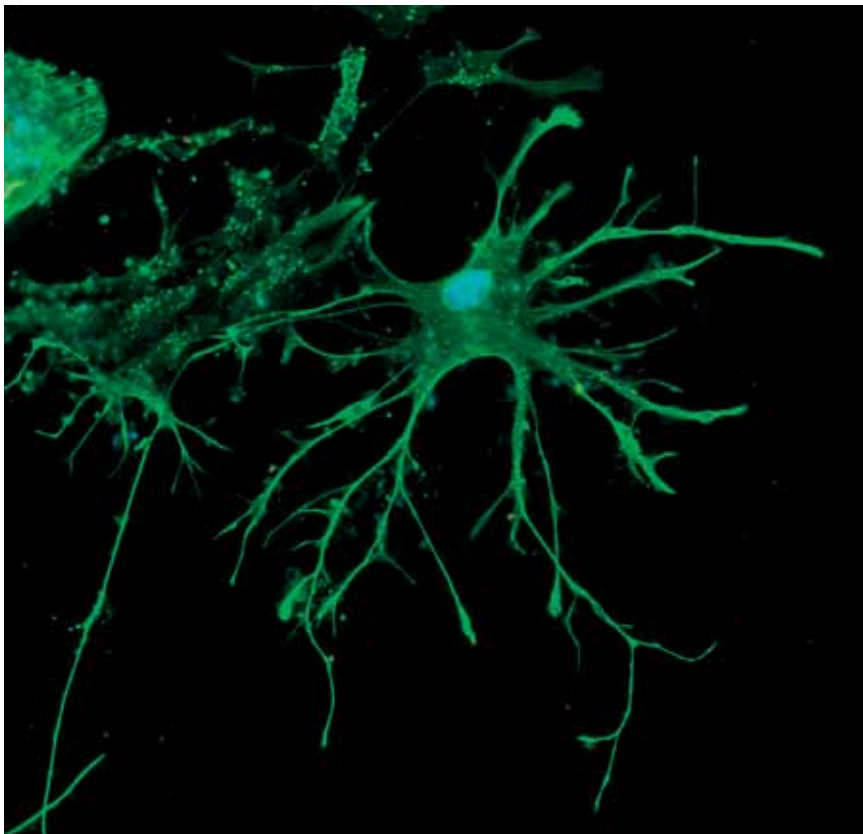
Durante o doutorado, orientado por Patrícia e Muotri, a bióloga Fabiele Russo obteve neurônios e astrócitos a partir dos dentes de leite de três garotos brasileiros. Eles haviam sido atendidos por um dos principais especialistas do país em autismo – o psiquiatra infantil Marcos Mercadante, da Universidade Federal de São Paulo (Unifesp), morto em 2011 – e apresentavam uma forma grave do problema. Tinham dificuldade de aprender tarefas e informações e de se relacionar. Também falavam poucas palavras e executavam movimentos repetitivos.

Neurônios gerados a partir de células do dente desses meninos eram mais imaturos e menos complexos. Tinham menos ramificações e faziam menos conexões com outros neurônios do que os obtidos do dente de crianças sem autismo. Eles também eram menos ativos (emitiam menos impulsos elétricos) do que os dos garotos do grupo de controle. “Alterações na forma e no funcionamento dos neurônios podem prejudicar o desenvolvimento e a atividade dos circuitos cerebrais”, lembra Fabiele.

A INFLUÊNCIA DOS ASTRÓCITOS

Uma inflamação parece estar por trás da alteração na forma e no funcionamento dos neurônios, indicam os resultados dos experimentos, publicados em outubro de 2017 na revista *Biological Psychiatry*. As evidências da inflamação vêm da análise dos astrócitos. Com forma de estrela, essas células fazem bem mais do que preencher o espaço entre os neurônios. Hoje se sabe que os astrócitos controlam a formação de ramificações dos neurônios e regulam a concentração de compostos, como os neurotransmissores, responsáveis pela comunicação química entre as células cerebrais.

Fabiele observou que os astrócitos gerados a partir de células de crianças com autismo produziam uma quantidade maior de uma molécula inflamatória: a interleucina 6 (IL-6). Análises anteriores, feitas em tecido cerebral *post mortem*, já haviam associado níveis elevados de IL-6 ao autismo, mas não permitiam saber se as altas concentrações dessa molécula eram causa ou consequência do problema. Os pesquisadores da USP e



Em forma de estrela, o astrócito controla o desenvolvimento de neurônios e regula a concentração de neurotransmissores

da Califórnia obtiveram indícios de que a inflamação antecede o autismo em uma sequência de experimentos em que neurônios foram cultivados com astrócitos com e sem sinais de inflamação.

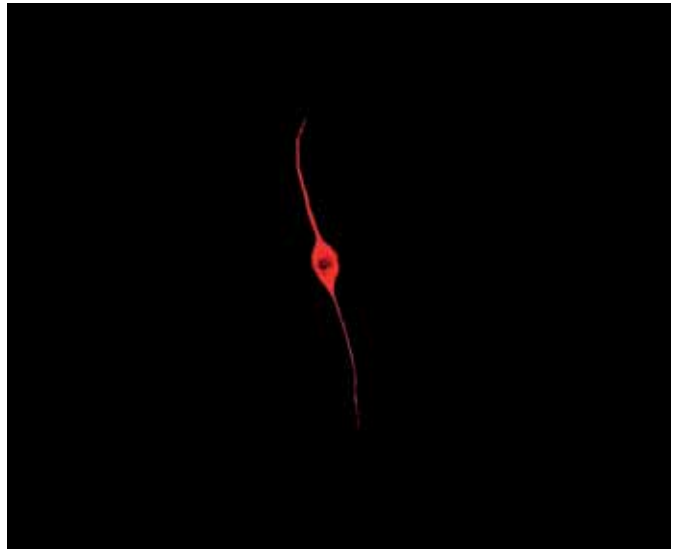
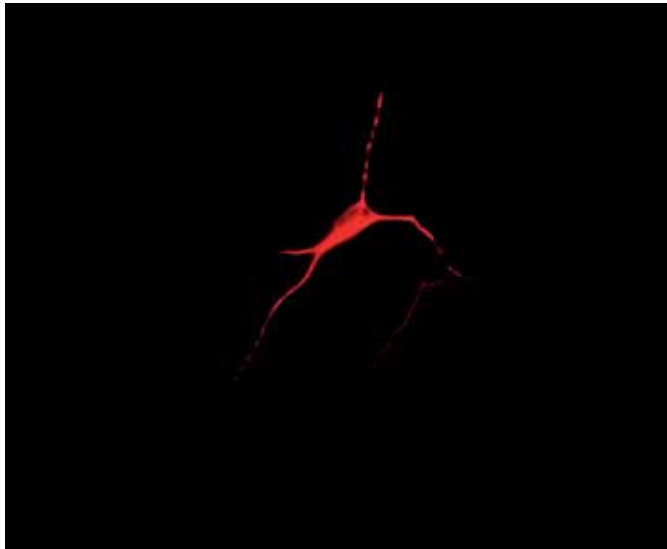
Neurônios saudáveis que se desenvolveram no mesmo recipiente que astrócitos inflamados apresentaram menos ramificações e conexões e se tornaram menos ativos. O oposto ocorreu quando neurônios obtidos do dente de crianças com autismo eram colocados durante alguns dias com astrócitos dos garotos sem o problema: na companhia de astrócitos saudáveis, os neurônios produziram mais ramificações e conexões com outras células (*ver página ao lado*). O mesmo se observou ao acrescentar à cultura de neurônios de pessoas com autismo um anticorpo que bloqueia a ação da IL-6.

“Essas alterações nos fazem pensar que algumas formas de autismo sejam

causadas por um problema nos astrócitos, e não nos neurônios”, conta Patrícia, coordenadora do braço brasileiro do projeto internacional “A fada do dente”, assim chamado em referência à figura do imaginário popular de alguns países que recompensa as crianças pelo dente de leite recém-caído deixado sob o travesseiro. Caso outros estudos confirmem a influência dessa neuroinflamação sobre certas formas de autismo, talvez, no futuro, torne-se possível desenvolver um tratamento farmacológico para o problema.

As terapias atuais se baseiam em acompanhamento psicoterápico para estimular a interação com outras pessoas e permitir uma vida mais independente, além do uso de medicação para combater problemas secundários, como a dificuldade de dormir ou de se concentrar. “Se um dia for possível reverter essas alterações celulares no cérebro de uma criança em desenvolvimento, talvez se torne viável amenizar as manifestações do autismo”, diz a neurocientista.

O caminho deve ser longo. “Apesar de funcionar bem *in vitro*, o tratamento que inibe a IL-6 em seres humanos deve ser investigado cuidadosamente, já que há relatos de que possa agravar a inflamação dos neurônios”, adverte Muotri,



pai de um garoto com autismo e, com Patricia e colaboradores, cofundador da Tismoo, empresa brasileira de biotecnologia, com filial nos Estados Unidos, que realiza análises genômicas em busca de causas e possíveis terapias para autismo e outros transtornos neurológicos de origem genética. Em um ensaio clínico recente que testou um composto para bloquear a ação da IL-6 em pessoas com uma forma de degeneração que atinge o nervo óptico e a medula espinhal, uma participante desenvolveu um quadro mais grave, relataram os pesquisadores em 2016 na revista *Multiple Sclerosis*.

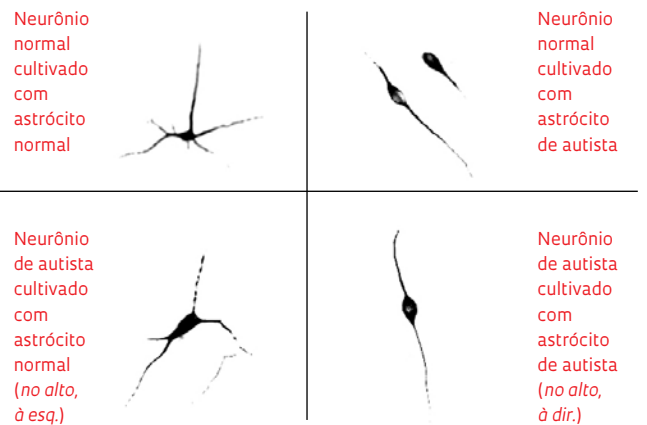
Anos atrás, Muotri já havia verificado que neurônios gerados a partir da reprogramação de células da pele de crianças com síndrome de Rett – um transtorno semelhante ao autismo, mas que só afeta meninas – também eram imaturos e apresentavam menos conexões. Em laboratório, esse efeito foi revertido ao aplicar sobre as células o antibiótico gentamicina ou o fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1). O problema, verificou-se depois, é que o primeiro é relativamente tóxico e o segundo não chega ao cérebro em níveis adequados (ver Pesquisa FAPESP nº 184).

O DESAFIO DO DIAGNÓSTICO

Ainda que se esteja distante de compreender as causas do autismo (alterações em 800 genes já foram associadas ao transtorno), a reprogramação celular e as análises genéticas talvez ajudem no diagnóstico, que nem sempre é fácil e pode demorar. A identificação do autismo é feita por um psiquiatra ou um neurolo-

O EFEITO DA INFLAMAÇÃO

Astrócitos inflamados, obtidos a partir de células do dente de crianças com autismo, prejudicaram o desenvolvimento dos neurônios, que apresentaram menos ramificações e eram menos ativos



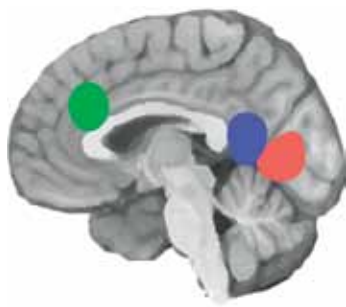
gista bem treinado, que examina a criança e avalia sua história de vida em busca de sinais de atraso no desenvolvimento e na capacidade de interagir socialmente. Os sintomas podem surgir cedo, nos primeiros meses de vida, e é importante que o diagnóstico seja precoce. É que o cérebro se desenvolve mais rapidamente nos primeiros anos após o nascimento, fase em que a criança começa a adquirir a linguagem e a interagir com adultos e outras crianças.

De modo geral, porém, o diagnóstico costuma tardar. Alguns especialistas estimam que, normalmente, a confirmação do autismo se dê por volta dos 3 anos de idade. No Brasil, essa identificação possivelmente demora ainda mais. Em uma entrevista à *Pesquisa FAPESP* em 2011, Mercadante, da Unifesp, calculava que ela só ocorresse por volta dos 5 ou 6 anos, quando os prejuízos na sociabilidade são mais difíceis de mitigar.

A fim de identificar as razões dessa demora, pesquisadores do Ambulatório de Cognição Social da Unifesp e da Universidade Presbiteriana Mackenzie realizaram entrevistas minuciosas com 19 mães de filhos diagnosticados com autismo na cidade de São Paulo. A maioria delas (68%) notou que havia algo anormal no desenvolvimento do filho antes de a criança completar 2 anos de vida – não respondia quando chamada pelo nome, não fazia contato visual ou não falava. Ao perceber o problema, quase todas as mulheres (79%) procuraram ajuda médica nos três meses seguintes. O diagnóstico, entretanto, só foi confirmado, em média, três anos após a suspeita inicial (em alguns casos levou oito anos). Apresentados em um artigo publicado em outubro de 2017 na *Revista Brasileira de Psiquiatria*, esses são os resultados parciais de um estudo maior, feito com 250 famílias de pessoas com autismo.

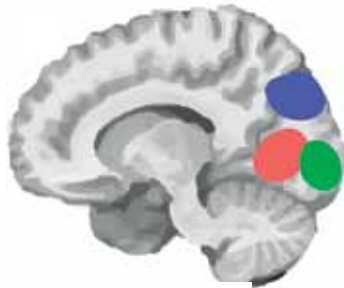
Diferenças no autismo

Análise de imagens indica haver uma alteração no padrão de ativação de áreas anteriores e posteriores do cérebro



Sincronia perdida

O giro paracingulado (●), na porção anterior do cérebro, deixa de ser ativado simultaneamente ao giro temporal-medial (●) e ao córtex pré-cúneo (●), na posterior, sugerindo uma redução na conectividade entre essas áreas



Sincronia reforçada

Aumenta a sincronia com que são ativados o polo occipital (●), o córtex intracalcarino (●) e o córtex occipital-lateral (●), indicando existir um aumento na conectividade entre essas áreas da região posterior do cérebro

Uma das razões do atraso no diagnóstico seria, portanto, o despreparo ou a desinformação do médico. “A maioria dessas mães, 84%, mencionou suas preocupações a respeito do comportamento atípico do filho primeiro ao pediatra, mas ouviu coisas como ‘crianças não têm que ser comparadas entre si’, ‘meninos se desenvolvem mais lentamente do que meninas’, ‘meninos são mais agitados’”, conta Sabrina Ribeiro, psicóloga do Ambulatório de Cognição Social da Unifesp e primeira autora do estudo. “Mais da metade delas, no entanto, se sentiu desencorajada a manifestar suas preocupações novamente”, relata a pesquisadora, que anos atrás, sob a orientação de Mercadante, realizou em Atibaia, interior de São Paulo, o maior levantamento da frequência de autismo entre crianças brasileiras – naquele estudo, 4 das 1.470 crianças (0,3% do total) tinham autismo. “Identificar o mais cedo possível é essencial para a intervenção precoce.”

APRENDIZAGEM DE MÁQUINA

Em Porto Alegre, uma equipe da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUC-RS), liderada pe-

lo neurocientista Augusto Buchweitz e pelo cientista da computação Felipe Meneguzzi, vem usando uma ferramenta computacional chamada aprendizagem de máquina para criar uma sequência de procedimentos autônomos (algoritmo) que tenta distinguir uma pessoa com autismo de outra sem o problema, a partir da análise de imagens do cérebro em funcionamento. O grupo desenvolveu um algoritmo classificado como *deep learning*, que aprende a fazer essa diferenciação de modo autônomo, sem a necessidade de dicas dos pesquisadores. A estratégia alcança um nível elevado de acerto em condições específicas e não tem o objetivo de substituir o diagnóstico clínico.

A equipe da PUC usou o algoritmo para avaliar cerca de 3.500 imagens do cérebro de 1.035 indivíduos (aproximadamente metade com e metade sem autismo) de diferentes regiões dos Estados Unidos, armazenadas no banco de dados do projeto Autism Imaging Data Exchange. Conforme já havia sido observado em análises anteriores, feitas com um número menor de participantes, há uma dessincronia entre o funcionamento de áreas da porção anterior e o de áreas da

região posterior do cérebro no autismo – nos indivíduos sem autismo, essas áreas estão mais sincronizadas. Segundo os resultados do estudo, publicado on-line em agosto na revista *NeuroImage: Clinical*, o algoritmo do grupo da PUC identificou corretamente 70% dos casos de autismo.

“Esse é o índice de acerto mais alto já obtido na análise de uma amostra grande e heterogênea”, conta Buchweitz, coordenador de pesquisa em ressonância magnética funcional no Instituto do Cérebro da PUC-RS. Estudos anteriores já alcançaram taxas mais elevadas, próximo a 100%, mas haviam sido feitos com algumas dezenas de participantes e usavam algoritmos que necessitam da supervisão dos autores para aprender a classificar as imagens. “A acurácia diminui significativamente em grupos maiores e com imagens obtidas em diferentes centros”, escreveram os pesquisadores no artigo.

O resultado animador, no entanto, não significa que as análises computacionais devam se tornar disponíveis tão cedo para diagnósticos na vida real. “Nosso objetivo não é substituir o diagnóstico clínico, que funciona”, conta Buchweitz. Uma das razões é que o poder de predição do algoritmo só é alto nos casos em que metade dos participantes tem autismo e metade não, como no banco de dados usado na avaliação inicial. É algo distante do que ocorre na população, na qual a frequência do problema gira em torno de 1%. “Nessas condições, a taxa de acerto real do algoritmo cairia para cerca de 4%”, afirma o neurocientista. “Nosso algoritmo talvez auxilie na identificação dos casos mais difíceis, em que o exame clínico não é conclusivo, pois ele poderia indicar quanto o funcionamento do cérebro do indivíduo se aproxima do de uma pessoa com autismo.” ■

Projeto

Geração de células pluripotentes induzidas de pacientes com transtorno autista (nº 11/20683-0); **Modalidade** Bolsa de Doutorado; **Pesquisadora responsável** Patrícia Cristina Baleeiro Beltrão Braga (USP); **Bolsista** Fabiele Baldino Russo; **Investimento** R\$ 73.006,05.

Artigos científicos

HEINSFELD, A. *et al.* Identification of autism spectrum disorder using deep learning and the ABIDE dataset. **NeuroImage: Clinical**. On-line. 30 ago. 2017.

RUSSO, F. *et al.* Modeling the interplay between neurons and astrocytes in autism using human induced pluripotent stem cells. **Biological Psychiatry**. out. 2017.

RIBEIRO, S. *et al.* Barriers to early identification of autism in Brazil. **Revista Brasileira de Psiquiatria**. out. 2017.