

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica

**O PAPEL DA OCITOCINA E DA MICROBIOTA INTESTINAL NO TRANSTORNO
DO ESPECTRO DO AUTISMO: UMA REVISÃO DA LITERATURA**

Barbara de Carvalho Simões da Fonseca

Trabalho de Conclusão do Curso de Farmácia-Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Orientador(a):

Prof. Dr. Helder I. Nakaya

Coorientador(a):

Dr. Thomaz Lüscher Dias (UFMG)

São Paulo

2020

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	2
LISTA DE ABREVIATURAS	3
RESUMO.....	5
1. INTRODUÇÃO	7
2. OBJETIVOS	9
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	10
3.1 Estratégia de busca	10
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	10
4.1 Ocitocina	10
4.1.1 Receptor de ocitocina	13
4.1.2 Regulação da expressão gênica do receptor de ocitocina	14
4.1.3 Dinâmica espacial-temporal da resposta cerebral a ocitocina	15
4.1.4 Terapias baseadas em ocitocina para o TEA	17
4.2 Microbiota.....	19
4.2.1 Alterações na microbiota e o TEA.....	20
4.2.2 Interação da microbiota com o Sistema Nervoso Central e suas implicações para o autismo	21
4.2.3 Terapias para o TEA baseadas em modulação da microbiota intestinal ...	23
4.3 A relação da ocitocina com a microbiota intestinal no TEA	24
5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	26
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer aos meus professores que, através de toda sua dedicação, contribuíram para a minha formação acadêmica, profissional e pessoal e para a de tantos outros estudantes.

Agradeço também a todos os funcionários da Universidade, em especial os da FCF, sem os quais não existiriam os cursos de graduação.

Ao orientador deste trabalho, professor Helder Nakaya, por aceitar minha proposta de trabalho, acatar minhas ideias ainda muito cruas e auxiliar no delineamento do escopo desse trabalho.

Ao meu coorientador, pós-doutorando Thomaz Luscher Dias, por seu suporte em todas as etapas do processo, por me guiar na definição final do tema e na busca pelos artigos que serviriam como base para todo o trabalho, por revisar o trabalho com frequência e, principalmente, por acreditar no meu trabalho nos momentos em que eu mesma não estava acreditando. Thomaz me ensinou mais do que ninguém sobre o processo de produção científica.

Aos meus pais e minha irmã, por todo o amor, carinho, paciência e apoio ao longo de todo o meu percurso acadêmico, sempre me ensinando a ser uma mulher forte e independente.

Aos meus times de Rugby, que se tornaram uma segunda família ao longo de toda a graduação e proporcionaram os momentos mais memoráveis desse período.

Aos meus amigos tropicanos, que sempre estiveram presentes no meu cotidiano, compartilhando comigo os melhores momentos e me apoiando nos piores, e ao meu clã, que vivenciou comigo todos os momentos da graduação.

Por fim, agradeço a todos que aqui não foram diretamente mencionados, mas que de alguma forma participaram dos meus processos nesses últimos cinco anos e meio.

Muito obrigada.

LISTA DE ABREVIATURAS

AGCC	Ácidos Graxos de Cadeia-curta
anti-MPB	Anti-Proteína Básica De Mielina
BDNF	Fator Neurotrófico Derivado Do Cérebro
cAMP	AMP cíclico
CARS	<i>Childhood Autism Rating Scale</i>
Cnr1	Receptor Canabinóide 1
DAG	1,2-Diacilglicerol
DSM-5	Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais – 5ª Edição
EROS	Espécies Reativas de Oxigênio
FFAR2	Receptores de Ácidos Graxos Livres 2
fMRI	Imagem Por Ressonância Magnética funcional
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GH	Hormônio de Crescimento
HPA	Hipotálamo-Pituitária-Adrenal
IFN- γ	Interferon-gama
IGF-1	Fator de Crescimento Semelhante à Insulina - 1
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IP3	Inositol 1,4,5-trifosfato
Kcnmb4	Subunidade de alta condutância do canal de cálcio ativado por potássio
LPS	Lipopolissacarídeo
MAPK	Proteína Quinase Ativada Por Mitógenos
mRNA	RNA mensageiro
NF- κ B	Fator Nuclear κ B

NIH	National Institute Of Health
PIK3	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato 3-quinase
PIP ₂	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
PKC	Proteína Quinase C
PVN	Núcleo Paraventricular
scRNAseq	Sequenciamento de RNA em células únicas
SNC	Sistema Nervoso Central
SON	Núcleo Supraóptico
SPF	Sem Patógenos Específicos
STAT6	Transdutor de Sinal e Ativador de Transcrição 6
TDAH	Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade
TEA	Transtorno do Espectro do Autismo
TLR-4	Receptores do tipo 4 Semelhante a Toll
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
TTM	Terapia de Transplante de Microbiota

RESUMO

FONSECA, B.C.S. **O papel da ocitocina e da microbiota intestinal no Transtorno do Espectro do Autismo: uma revisão da literatura.** 2021. Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia e Bioquímica - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021

Palavras-chave: autismo, transtorno do espectro do autismo, ocitocina, microbiota intestinal.

INTRODUÇÃO: O Transtorno do Espectro do Autismo compreende um conjunto de doenças neuropsiquiátricas e é caracterizado por padrões repetitivos de comportamentos, interesses e atividades, dificuldades de interações sociais e de comunicação. Seu diagnóstico é feito com base nas manifestações clínicas, apesar de alguns biomarcadores como o IGF-1, a anti-PBM e a serotonina serem indicados para contribuir nesse processo. A ocitocina e a microbiota intestinal são dois alvos de estudos e discussões que trazem novas perspectivas para a compreensão da etiologia do autismo e servem como base para novas terapias. **OBJETIVOS:** Revisar a literatura científica e discutir o papel da ocitocina e da microbiota intestinal no transtorno do espectro do autismo, buscando compreender os mecanismos através dos quais esses fatores influenciam na etiologia do transtorno. Com base nessas informações, revisar e discutir também as abordagens terapêuticas pautadas nesses dois eixos e verificar se existe uma intersecção entre eles. **MATERIAIS E MÉTODOS:** Foram efetuadas buscas por artigos científicos publicados em jornais revisados por pares de 1990 até Maio de 2021. O banco de dados utilizado foi o Pubmed do National Institute of Health (NIH), que engloba artigos publicados de todas as nacionalidades. **RESULTADOS E DISCUSSÃO:** A ocitocina é um neurotransmissor que ganhou muita atenção nos últimos anos entre pesquisadores do TEA, uma vez que atua em regiões diretamente relacionadas ao controle emocional e cognição social. Diversos fatores podem alterar a efetividade de sua sinalização, dentre eles a concentração no local de ação, a concentração e a afinidade de seus receptores. A terapia pautada na administração intranasal de ocitocina acabou ganhando bastante espaço nas discussões sobre novas perspectivas de tratamento, tendo um perfil de tolerância e segurança muito bom e efeitos significativos na melhora das funções sociais. A microbiota, por sua vez, exerce importante papel regulador da neurotransmissão e da resposta imune.

Pacientes do TEA apresentam elevada incidência de distúrbios do sistema gastrintestinal, podendo exercer influência no neurodesenvolvimento e na cognição e comportamentos sociais, todos alterados nesses pacientes. A Terapia de Transplante de Microbiota (TTM) ainda está começando a passar por testes clínicos, mas se demonstrou bastante eficiente na melhora dos sintomas do autismo.

CONCLUSÃO: As duas vias abordadas exercem papel importante na etiologia do autismo, sendo que existem também pontos de intersecção entre elas. As intervenções terapêuticas discutidas apresentam resultados já promissores, sendo que a da ocitocina tem espaço para aprimoramentos e a de TTM ainda precisa passar por mais ensaios clínicos que demonstrem, de fato, sua eficácia. Existe, ainda, a possibilidade de uma intervenção interagir de maneira positiva com a outra, maximizando as melhorias para o paciente.

1. INTRODUÇÃO

O Transtorno do Espectro do Autismo (TEA) compreende um conjunto de doenças neuropsiquiátricas do chamado transtorno invasivo de desenvolvimento, incluindo o autismo infantil precoce, autismo infantil, autismo de Kanner, autismo de alto funcionamento, autismo atípico, transtorno global de desenvolvimento sem outra especificação, transtorno desintegrativo da infância e transtorno de Asperger (1,2). Em geral, o TEA é caracterizado por um grupo de sintomas característicos: padrões restritos e repetitivos de comportamentos, interesses e atividades, dificuldade de interações sociais e de comunicação verbal e não-verbal (1). O diagnóstico é feito com base nas manifestações clínicas e está sujeito à subjetividade da interpretação de cada médico, o que faz com que o número de casos reportados em diferentes países acabe variando de acordo com a prática clínica do local. Porém, a Organização Panamericana de Saúde estima que 1 em cada 160 crianças no mundo possuem algum TEA (3).

Além dos sintomas principais ou primários, existe uma gama de sintomas secundários que podem estar presentes ou não nos indivíduos dentro do espectro, podendo ser comportamentais, como agressividade, irritabilidade e ansiedade ou desordens associadas, como Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH), epilepsia e desordens no processamento de informações sensoriais (1). Como ainda não existe um tratamento específico para o autismo, a maioria das intervenções terapêuticas são feitas visando reduzir esses sintomas, sendo sempre muito individualizadas e multimodais (4). O diagnóstico precoce é essencial no curso do tratamento, pois garante um melhor desenvolvimento das habilidades sociais, de linguagem e interativas, além de prevenir o agravamento dos sintomas secundários.

A etiologia do TEA ainda não é bem elucidada, principalmente por ser geneticamente heterogênea. As estimativas de hereditariedade variam entre 37% e 90%, de acordo com as taxas de concordância entre gêmeos. Cerca de 15% dos casos de TEA são associados a uma mutação genética conhecida, com mutações *de novo* em genes específicos associados ao transtorno, enquanto os outros 85% de casos são chamados de idiopáticos, por não terem causa conhecida (2). De maneira geral, o que ocorre são alterações genéticas e/ou epigenéticas que afetam o desenvolvimento do cérebro, afetando as conexões neurais das vias relacionadas à

comunicação social. Essas alterações sofrem influência de alguns fatores ambientais. Um desses fatores é a idade avançada dos pais, que leva ao aumento no risco de novas mutações. Além disso, existem as exposições pré-natais, como o alcoolismo, tabagismo ou uso de medicamentos durante a gestação, e ainda fatores de risco perinatais (i.e. nascimento prematuro, baixo peso corpóreo, hipóxia). Por fim, existe também o risco por exposição a agentes tóxicos (5).

O diagnóstico de TEA é feito com base nas manifestações clínicas comportamentais. De acordo com a 5ª edição do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-5, 2013), elaborado pela Associação Americana de Psiquiatria, os dois critérios essenciais para que se caracterize um paciente como pertencente ao espectro são: o prejuízo persistente na comunicação social recíproca e na interação social e padrões restritos e repetitivos de comportamento, interesses ou atividades. Como esses dois sintomas podem se apresentar em diferentes extensões, é recomendado que se tenha múltiplas fontes de informação, incluindo relatos de familiares e cuidadores. Ainda não existe um diagnóstico diferencial para o TEA pautado em biomarcadores. No entanto, o Índice do Autismo (AI) sugere três biomarcadores que podem ser usados para detectar anormalidades e determinar o risco de um recém nascido vir a desenvolver autismo. Esses marcadores são o fator de crescimento semelhante à insulina - 1 (IGF-1), a anti-proteína básica de mielina (anti-MPB) e a serotonina (6,7). O IGF-1 é produzido na placenta e estimulado pelo Hormônio de Crescimento (GH) durante a gestação e, após o nascimento, sua produção mais significativa ocorre no fígado. Estudos demonstram que o IGF-1 está presente em níveis mais baixos no líquido cérebro-espinhal de indivíduos do espectro (8). Essa proteína afeta a taxa de produção de mielina pelos oligodendrócitos no Sistema Nervoso Central (SNC). A hipomielinização prejudica a formação de sinapses e vias de sinalização celulares, prejudicando assim a neurogênese e o neurodesenvolvimento (9,10). A deficiência na mielinização pode também ser devida à presença do anticorpo contra a proteína básica de mielina, que é uma das principais proteínas estruturais do SNC. Por fim, a serotonina é encontrada usualmente com níveis séricos elevados em pacientes do espectro do autismo. Esse neurotransmissor exerce papel regulador nos processos de neurogênese, diferenciação neural e sinaptogênese. Janusonis, Gluncic e Rakic, 2004, demonstraram que níveis alterados de serotonina no período pré-natal provocam alterações no desenvolvimento cortical (11). A hiperserotoninemia parece

ter diferentes causas, dentre elas a deficiência na atividade da enzima metabolizadora de triptofano, seu precursor, o que leva ao aumento de sua disponibilidade e conseqüentemente a síntese de serotonina, e também o aumento na expressão de seu transportador (12).

Além da serotonina, outro neurotransmissor que vem sendo muito associado ao TEA nos últimos anos é a ocitocina. Com produção no hipotálamo, ela tem liberação em diversas estruturas do SNC, como a amígdala, ligada ao aprendizado emocional e a processos cognitivos como memória e atenção (13), o núcleo dorsal da rafe, importante na regulação de comportamentos associados à recompensa (14) e área tegmental ventral, uma região com funções heterogêneas, mas que vale ser destacada por seu papel em reforços positivos e negativos, na tomada de decisão, memória de trabalho e aversão (15). Alguns pacientes do espectro possuem níveis alterados de ocitocina no cérebro (16). Uma vez que muitas das estruturas cerebrais em que a ocitocina exerce papel regulador atuam em funções relacionadas aos distúrbios comportamentais característicos do TEA, esse neurotransmissor se tornou um possível alvo terapêutico.

Um fator também observado em pacientes com autismo é a incidência quatro vezes maior de sintomas do trato gastrintestinal com relação à população neurotípica (17). Os sintomas vão desde constipação, diarreias e dores abdominais até quadros mais complexos como a Doença Inflamatória Intestinal (18,19). Através do eixo de comunicação microbiota intestinal-cérebro e da mediação do sistema imune, essas alterações na composição da microbiota exercem efeito neuromodulador (20), justificando alguns dos comportamentos observados no TEA. Ainda não foi estabelecida uma relação causal para essas observações, porém novas possibilidades terapêuticas surgiram a partir delas, incluindo a Terapia de Transplante de Microbiota (21).

2. OBJETIVOS

Revisar a literatura científica e discutir o papel da ocitocina e da microbiota intestinal no transtorno do espectro do autismo, buscando compreender os mecanismos através dos quais esses fatores influenciam na etiologia do transtorno. Com base nessas informações, revisar e discutir também as abordagens

terapêuticas pautadas nesses dois eixos e verificar se existe uma intersecção entre eles.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Foram efetuadas buscas por artigos científicos publicados em jornais revisados por pares de 1990 até Maio de 2021. O banco de dados utilizado foi o Pubmed do National Institute of Health (NIH), que engloba artigos publicados de todas as nacionalidades.

3.1 Estratégia de busca

Com base nos objetivos pretendidos do trabalho, escolhemos as palavras-chave que serviriam como ponto de partida para as buscas: “autismo”, “ocitocina”, “receptor de ocitocina” e “microbiota intestinal”. A partir da aplicação dessas palavras-chave, em inglês, de forma isolada ou combinada, buscou-se primeiro grandes revisões bibliográficas que trouxeram uma visão mais geral sobre os assuntos.

Com base nas informações iniciais e estrutura das grandes revisões, foi possível estruturar os tópicos que seriam abordados no presente trabalho e então buscar 2 a 5 artigos por tópico. A partir desses artigos e da necessidade por informações mais detalhadas e aprofundadas, buscas cada vez mais específicas foram sendo feitas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Ocitocina

A ocitocina é um nonapeptídeo hipotalâmico com função reprodutiva. Sua liberação sistêmica pela glândula pituitária estimula as contrações uterinas no momento do parto e a ejeção de leite durante a amamentação. Nos últimos anos, a ocitocina ganhou destaque por sua ação como neurotransmissor no SNC. Estudos comportamentais demonstram que ela exerce um papel importante na cognição social e em comportamentos sociais, como a criação de memória social, comportamento maternal, criação de laços, estabelecimento de relações de confiança e conformidade, julgamento moral, generosidade e cooperação (22). Por

essas características e pelo fato de terem sido observados níveis alterados desse neurotransmissor em pacientes do espectro do autismo (16), a ocitocina tornou-se um alvo promissor no tratamento do TEA.

A ocitocina é sintetizada no hipotálamo por dois tipos de células: os neurônios magnocelulares e os parvocelulares. Os neurônios magnocelulares estão localizados nos núcleos supraóptico e paraventricular e seus axônios se projetam para o lobo posterior da glândula pituitária, que faz sua liberação sistêmica em resposta a estímulos como trabalho de parto, amamentação e certos tipos de stress (23,24). Já os neurônios parvocelulares, localizados apenas no núcleo paraventricular, se projetam para diferentes regiões cerebrais incluindo o núcleo accumbens, o núcleo dorsal da rafe e a área tegmental ventral, regiões que estão ligadas à regulação das funções sociais. Na Figura 1, é possível ver a elevada presença do mRNA codificador de ocitocina nesses dois núcleos hipotalâmicos. A barreira hematoencefálica é pouco permeável à ocitocina, então esses dois sistemas funcionam de forma aparentemente paralela, sendo que os níveis locais no cérebro não dependem da concentração sistêmica (24).

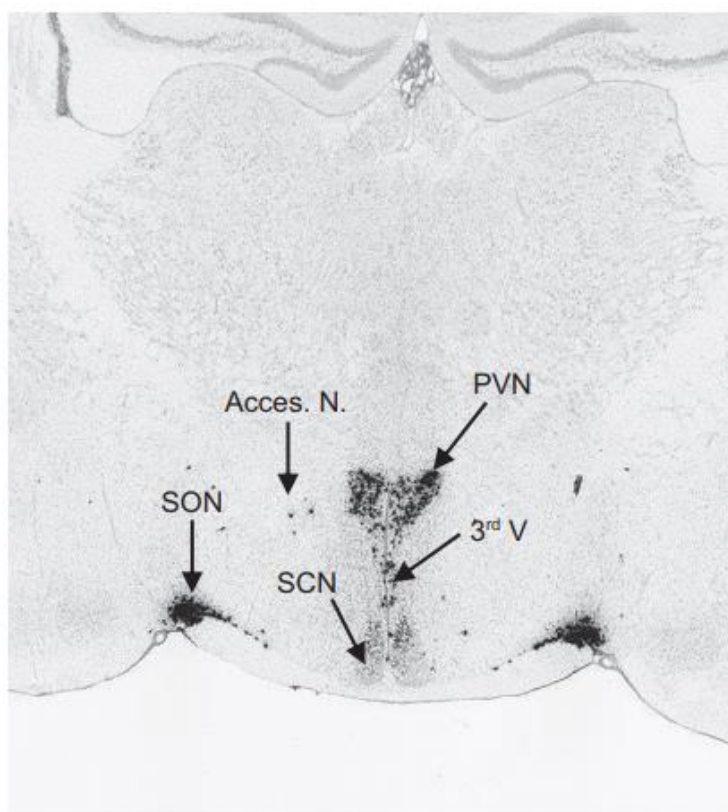


Figura 1: Secção coronal de um cérebro de rato adulto mostrando elevada expressão de mRNA de ocitocina nos núcleos paraventricular (PVN) e supraóptico (SON) do hipotálamo. Existe também uma pequena expressão nas paredes do terceiro ventrículo (3rd V), no núcleo acessório (Acces. N.) e no núcleo supraquiasmático (SCN). Fonte: (25)

A classificação dos neurônios de ocitocina em parvocelulares e magnocelulares não depende apenas da localização de seus axônios: um estudo de sequenciamento de RNA em células únicas (scRNAseq) identificou que existem 181 genes que são expressos de forma diferente em cada um dos tipos celulares (26). A partir de dados transcricionais, os autores observaram que os neurônios magnocelulares possuem alta expressão dos genes da Calbindina 1 (Proteína ligadora de cálcio) e *Kcnmb4* (subunidade de alta condutância do canal de cálcio ativado por potássio), enquanto os neurônios parvocelulares expressam em maior quantidade os genes de *Relina* (serinoprotease de matriz extracelular) e do receptor canabinoide 1 (*Cnr1*). Utilizando esses genes como marcadores para diferenciar os dois tipos de neurônios ocitocinérgicos, os autores do trabalho observaram que apenas os neurônios parvocelulares influenciam em vias relacionadas aos comportamentos sociais ligados ao autismo, corroborando a ideia de que a liberação local e a sistêmica são independentes e que suas funções não estão relacionadas uma com a outra. Além disso, os autores deste trabalho demonstraram que genes de risco para o autismo estão enriquecidos nos neurônios parvocelulares, o que corrobora a participação diferencial desses neurônios no transtorno. Esses dados ainda são muito recentes, mas evidenciam a existência de uma via específica de neurotransmissão de ocitocina que influencia na cognição social e que está alterada no autismo (26).

A disponibilidade de ocitocina em um tecido ou região cerebral depende da taxa de liberação no local e da degradação enzimática da molécula. O processo de metabolização é feito pela ocitocinase amino-peptidase placentar e pela L-cistina amino-peptidase. Em tecidos periféricos, essas enzimas fazem com que a meia-vida da ocitocina circulante seja entre 3 e 6 minutos. No SNC, a degradação de ocitocina por essas enzimas resulta em uma meia-vida de até 20 minutos (25). Já a taxa de liberação local depende da expressão gênica. A ocitocina é codificada por um gene presente no mesmo *locus* do gene que codifica a vasopressina, porém eles são transcritos em sentidos opostos. Esse *locus* gênico está localizado no cromossomo 20 e possui dois íntrons e três éxon, sendo que o primeiro éxon contém a região do promotor, a região codificadora do nonapeptídeo e parte da região codificadora da neurofisina I (transportador associado da ocitocina), enquanto os outros dois complementam a neurofisina. O promotor do gene da ocitocina possui sítios de ligação para fatores de transcrição funcionais semelhantes a receptores de

estrógeno/ ácido retinóico. Esse tipo de sítio é capaz de se ligar a vários receptores hormonais nucleares, como o estrógeno, presente nos neurônios magnocelulares e ativador de expressão e liberação sistêmica de ocitocina. A liberação no próprio SNC também é regulada por esses fatores hormonais: a ocitocina influencia na criação de laços afetivos entre casais e entre mães com seus filhos no período do puerpério, situações em que a taxa de hormônios reprodutivos é mais alta. No entanto, a regulação ocitocinérgica não é limitada à resposta a hormônios. Fatores como estimulação osmótica e estresse físico e emocional também são relevantes para o estímulo da secreção de ocitocina.

4.1.1 Receptor de ocitocina

Para que a ocitocina disponível possa atuar de maneira efetiva, gerando uma resposta celular, é necessário que as células alvo possuam o receptor específico para ela. O receptor de ocitocina é um polipeptídeo de 389 aminoácidos com 7 domínios transmembrânicos e pertence à classe A ou I dos receptores acoplados à proteína G. Foi demonstrado que ele pode se acoplar a proteínas do tipo Gq/G₁₁ ou Gi/Go, dependendo da localização da célula-alvo e da concentração de ocitocina, fazendo com que provoque diferentes sinalizações intracelulares. Ao ativar uma proteína Gq/G₁₁, ocorre a ativação da enzima fosfolipase C-β, que hidrolisa o fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP₂) formando inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) e 1,2-diacilglicerol (DAG). O IP3 mobiliza os estoques intracelulares de Ca²⁺ enquanto o DAG ativa a proteína quinase C (PKC), responsável pela fosforilação de diversas proteínas-alvo (27). Em células da musculatura lisa, como o miométrio, essa cascata de ativação leva à contração das cadeias de miosina e conseqüentemente às contrações uterinas observadas durante o parto. Já em células neurais, a elevação na concentração de Ca²⁺ altera a excitabilidade e conseqüentemente padrões de ativação sinápticos (24). A ativação de proteínas do tipo Gi/Go, por sua vez, leva à inibição da adenilato ciclase, reduzindo a concentração de AMP cíclico (cAMP) e ativa a fosfatidilinositol 4,5-bifosfato 3-quinase (PIK3) e a proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK), enzimas que regulam diretamente a atividade de receptores iônicos de Ca²⁺, K⁺ e Na⁺. Dessa forma, os receptores de ocitocina acoplados à proteína G também regulam a excitabilidade da membrana, a secreção, liberação de neurotransmissores e plasticidade sináptica em células neurais (27).

4.1.2 Regulação da expressão gênica do receptor de ocitocina

Além da presença do receptor, outros dois fatores importantes na regulação da resposta celular à ocitocina são sua afinidade e a quantidade presente na superfície celular. Estudos demonstram que o Zn^{2+} , Mg^{2+} , Ni^{2+} , Mn^{2+} and Co^{2+} aumentam a afinidade entre a ocitocina e seu receptor, pois modulam diretamente o sítio de ligação e também induzem uma mudança conformacional na estrutura da ocitocina que favorece sua ligação ao receptor. Outro componente importante para a estabilidade e afinidade dos receptores é o colesterol. Ele atua nas células eucarióticas de forma a regular a fluidez da bicamada lipídica e a formação de microdomínios de membrana e modular a estabilidade e função das proteínas presentes na membrana, como receptores acoplados à proteína G. No caso específico dessa classe de receptores, eles necessitam do colesterol para manutenção e estabilização do sítio ligante e são mais estáveis quando localizados em microdomínios que contém colesterol. Baixos níveis de colesterol foram identificados em pacientes com TEA, levantando a hipótese que ocorre uma diminuição da resposta dos receptores à ocitocina, contribuindo para os déficits comportamentais observados. Já a quantidade de receptores presentes na membrana depende não só da expressão gênica, mas também do processo de dessensibilização. A administração aguda e repetitiva de ocitocina poderia levar à hiperestimulação e diminuição da responsividade a estímulos múltiplos. Dessa forma, ocorre um processo chamado dessensibilização, que é feito através da internalização dos receptores (27). O fato de se administrar ocitocina sintética (e.g. pitocina) a gestantes durante o trabalho de parto como indutor de contrações levantou a hipótese de que poderia provocar a dessensibilização dos receptores no cérebro do feto e prejudicar o neurodesenvolvimento, sendo uma possível etiologia para o TEA. Para comprovar essa hipótese, Gottlieb desenvolveu um modelo matemático que estimou a concentração de pitocina que de fato atinge o SNC de um bebê e, para sua surpresa, chegou à conclusão de que na verdade esse não é um mecanismo relevante para o TEA (28).

O receptor da ocitocina é codificado por um único gene contendo três íntrons e quatro éxons e está localizado no cromossomo 3 (24,25,29,30). A região do promotor possui sítios de ligação para diversos fatores de transcrição, dentre eles o motivo semelhante a TATA (25), elementos responsivos a estrógeno (31), interleucina 6 (IL-6) e fator nuclear κB (NF- κB) (31). Há evidências de que a

progesterona também exerce certo papel na regulação da transcrição, mas o mecanismo ainda não é muito bem compreendido. Os micro-RNAs também regulam a síntese dos receptores de ocitocina, atuando a nível transcricional e translacional (25,32,33).

A expressão diferencial dos receptores de ocitocina nos tecidos e em diferentes regiões do cérebro é um ponto que há anos vem sendo investigado. Estudos demonstram que essa regulação se dá através da metilação do DNA na região do promotor, de forma a diminuir sua acessibilidade aos fatores de transcrição, uma vez que foi observada uma relação inversa entre metilação do promotor e níveis de mRNA (25). Análises *post-mortem* de cérebros de um subgrupo de pacientes do espectro do autismo revelaram que o gene codificador do receptor de ocitocina estava significativamente mais metilado na região do córtex temporal quando comparado ao grupo controle (34). Isso sugere que o padrão de metilação diferencial do receptor de ocitocina em regiões específicas do cérebro, afetando a atividade cerebral e conseqüentemente alguns padrões de comportamento, pode ser uma das etiologias do TEA.

4.1.3 Dinâmica espacial-temporal da resposta cerebral a ocitocina

Os receptores de ocitocina estão presentes em diversas regiões do cérebro e regulam de forma positiva ou negativa uma gama de funções relacionadas ao controle emocional, sistema de recompensa e atenção. A partir da administração intranasal de ocitocina, uma série de estudos foi conduzida buscando estabelecer relação temporal entre diferentes redes de conexões e regiões cerebrais. Porém, as metodologias utilizadas registravam apenas estados únicos, como fotografias transversais, dificultando o estabelecimento de uma relação causal. Um estudo conduzido por Jiang Xi et.al, 2021 utilizou Imagem por Ressonância Magnética funcional (fMRI) para estabelecer uma dinâmica temporal entre os chamados estados temporais, que consistem em um segmento de tempo em que o sinal da fMRI exhibe um padrão funcional similar entre as regiões cerebrais de interesse. Para o estudo, foram definidas 15 regiões de interesse que são tidas como chave por sua influência pela ocitocina, sendo elas: amígdala medial e lateral, cíngulo posterior e dorsal anterior, ínsula posterior e anterior, córtex orbitofrontal lateral e medial, córtex pré-frontal dorsomedial e ventromedial, corpo estriado ventral e dorsal e área tegmental ventral. Para estabelecer o estado de repouso, utilizaram-se dados de

estudos randômicos duplo-cego conduzidos previamente com o objetivo de investigar os efeitos farmacológicos da administração intranasal de ocitocina, atingindo um expressivo número de 200 participantes. Primeiramente, os autores observaram que a ocitocina não altera as características relacionadas ao estado temporal (frequência de mudança, probabilidade de transição entre estados vizinhos e o tempo de duração médio de cada estado). Com relação às alterações nas conexões neurais, os resultados desse estudo apontaram que a ocitocina influencia de maneira expressiva a conectividade entre as 15 áreas estudadas, regulando a comunicação inter e entre redes relacionadas à emoção, atenção, saliência, recompensa, cognição social e estado padrão (35).

Um destaque especial pode ser dado à rede de saliência, que é composta pelas ínsulas anterior e posterior e pelo cingulado dorsal anterior. Essa rede atua de forma a selecionar os estímulos mais relevantes (salientes) dentre todos aqueles recebidos pelo ambiente externo, o que influencia a tomada de decisão. No estudo de Jiang Xi e colaboradores, os autores demonstraram que a ocitocina modula a rede de saliência por estímulos sociais de maneira contexto-dependente. A ocitocina fortalece interações recíprocas entre a rede de saliência e o córtex medial frontal e orbitofrontal, envolvidas no controle cognitivo e emocional e aumenta as conexões efetivas entre a ínsula posterior e regiões de recompensa dos gânglios da base (corpo estriado dorsal e ventral) e regiões envolvidas no processamento emocional (amígdala). Isso permite levantar a hipótese de que no autismo os baixos níveis de ocitocina estão diretamente relacionados à dificuldade de se compreender estímulos sociais, levando muitas vezes à falta de empatia e a alguns sintomas secundários como irritabilidade, agressividade e ansiedade. Constatou-se também um aumento na conectividade entre a rede de saliência e a rede de comportamento padrão, uma interação importante para a troca de atenção entre pistas internas e externas e com implicações para o processo de cognição social e de auto-referência (35). Isso pode também ter relevância no quadro do autismo, uma vez que muitos pacientes apresentam deficiência cognitiva-social e acabam ficando presos em comportamentos repetitivos. Isso pode ser uma consequência da dificuldade desses pacientes em migrar a atenção dos estímulos interiores para os estímulos do mundo externo.

4.1.4 Terapias baseadas em ocitocina para o TEA

A deficiência nos níveis centrais de ocitocina não é observada em todos os pacientes do TEA e não é constatado que esse é o mecanismo responsável pelo aparecimento dos sintomas. Ainda assim, devido à grande quantidade de evidências do papel relevante da ocitocina no TEA, pesquisadores começaram a pensar na administração de sua forma sintética por via intranasal como forma de tratar os sintomas do transtorno, de maneira a compensar os déficits de desenvolvimento das regiões em que a ocitocina atua e que são tão relevantes para a sintomatologia. Por se tratar de uma via de administração fácil e com os resultados muito positivos obtidos em estudos pré-clínicos (36,37), um grande número de ensaios clínicos foi conduzido na última década buscando entender e avaliar os efeitos desse tratamento nos pacientes com autismo (38–43). Os resultados, porém, foram controversos no que diz respeito à melhora dos sintomas principais. Visando validar algumas das conclusões, Huang et al., 2021 conduziram uma meta-análise com 28 estudos selecionados, contemplando 745 pacientes do TEA. Esses autores chegaram à conclusão de que a ocitocina não melhora de forma significativa os sintomas não-sociais, mas possui efeitos benéficos nas funções sociais, incluindo o contato visual, reconhecimento de emoções e comportamentos pró-sociais (como identificação de pistas sociais) (22). Apesar de os alvos de ação da ocitocina endógena serem bem conhecidos e seus efeitos também, não se sabe ainda o quanto da ocitocina administrada de forma intranasal é capaz de atravessar a barreira hemato-encefálica e atingir de fato o SNC nas regiões críticas para o quadro de autismo, como podemos ver na Figura 2. Um caminho interessante para tornar esse tratamento mais eficiente seria desenhar um sistema de entrega da droga que garantisse uma maior permeabilidade à barreira hemato-encefálica e que fosse alvo-dirigido.

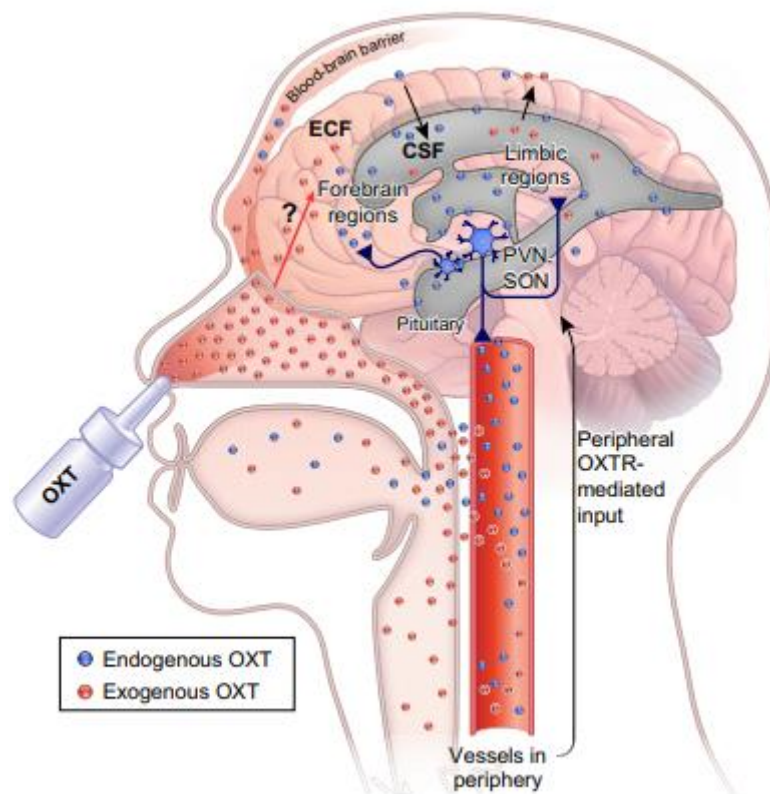


Figura 2: Representação esquemática da administração intranasal de ocitocina e distribuição para o SNC, sem alvos específicos. Em contraste, temos a representação da síntese e liberação endógena, com alvos específicos. ECF: fluido extracelular; CSF: fluido cerebrospinal; PVN: núcleo paraventricular do hipotálamo; SON: núcleo supraóptico; AN: núcleo acessório. Fonte: (25)

Mesmo com a grande quantidade de estudos clínicos conduzida, não foi estabelecido ainda qual é o nível de segurança do tratamento com ocitocina intranasal. Para buscar essa resposta, Cai et al., 2018, conduziram uma revisão sistemática e uma meta-análise envolvendo 5 estudos e 223 participantes, sendo que 123 receberam ocitocina e os outros 100, placebo. Os eventos adversos mais comuns observados foram desconforto nasal, cansaço, irritabilidade, diarreia e irritação na pele, porém não houve diferença significativa (valor $P < 0.05$) entre os dois grupos observados. Os eventos adversos graves reportados também não foram estatisticamente relevantes, o que levou os autores a concluir que esse tratamento é bem tolerado e seguro, porém sugerem a necessidade de estudos clínicos mais amplos (44). Considerando esse perfil de segurança e os benefícios trazidos pelo tratamento, a ocitocina intranasal ainda é foco de novos estudos e vista como uma alternativa para os pacientes do TEA.

4.2 Microbiota

O corpo humano é hospedeiro de milhões de microorganismos presentes em diferentes órgãos, tecidos e fluidos, compondo a chamada microbiota humana. O intestino é o compartimento em que essa microbiota atinge a mais elevada densidade e um dos órgãos em que ela desempenha papel mais crítico (45). A microbiota intestinal é responsável pelo metabolismo de certos alimentos, tornando seus nutrientes acessíveis para o hospedeiro. A microbiota intestinal também é responsável pela formação de uma primeira barreira de proteção contra patógenos, através da competição e da produção de substâncias que inibem o crescimento de microorganismos que podem causar doenças. Ela também auxilia no processo de maturação do sistema imune ao estimular a imunidade inata e adquirida (46). De maneira geral, a composição da microbiota intestinal segue um equilíbrio dinâmico, sofrendo variações sutis no dia-a-dia por influência de fatores ambientais como temperatura, pH, dieta, atividade física, estresse e ingestão de medicamentos (46,47).

O desenvolvimento e a maturação da microbiota intestinal de um indivíduo desde seu nascimento até a vida adulta seguem um padrão dinâmico, mas não ocorre de forma aleatória. Evidências atuais indicam que a colonização desse órgão é iniciada ainda no útero materno, a partir da placenta (48), preparando o sistema imune do feto para quantidades muito mais elevadas de microorganismos que virão a partir desse momento (49). A primeira grande colonização é iniciada no momento do parto e com a amamentação, sendo que a composição desse microbioma é influenciada pelo tipo de parto. Bebês nascidos de parto normal entram em contato com a microbiota vaginal e fecal da mãe, levando à presença de microorganismos associados à vagina como *Lactobacillus* e *Prevotella*. Bebês nascidos de cesárea acabam não sendo expostos a esses microorganismos, e sim aos ambientais, como os da pele de sua mãe e aqueles presentes no ambiente hospitalar (49,50). O leite materno proporciona contato com nutrientes e agentes pró e anti microbianos que influenciam na colonização do sistema digestivo por microorganismos. Já as fórmulas alimentares proporcionam uma composição de nutrientes que favorecem microorganismos diferentes daqueles que se beneficiam dos nutrientes presentes no leite materno. Apesar de ocorrerem essas variações, os primeiros colonizadores são sempre bactérias anaeróbias facultativas que, através do processo de fermentação, criam um ambiente propício à colonização por anaeróbios estritos. Esse processo

ocorre durante os primeiros 12 meses do bebê e, a partir de então, é estabelecida uma colonização semelhante à dos adultos, com uma variedade menor de microorganismos (51).

4.2.1 Alterações na microbiota e o TEA

Quando ocorre um desequilíbrio na composição da microbiota e a população de microorganismos patogênicos é favorecida em detrimento de populações benígnas, ocorre um quadro chamado de disbiose (18). Como consequência, tem-se a produção elevada de certos metabólitos e endotoxinas, causando aumento no estado inflamatório-imune e da produção de citocinas pró-inflamatórias. Em pacientes com autismo, são observadas alterações significativas na composição da microbiota que levam a um estado de disbiose constante e maiores índices de distúrbios gastrointestinais (18). Foram encontrados em pacientes do espectro diversas cepas de *Clostridium*, *Ruminococcus*, *Bacteroidetes*, *Bacteroides*, *Firmicutes* e *Desulfovibrio*, bem como menores níveis de *Bifidobacterium* e maiores níveis de *Lactobacillus*, bactérias consideradas benéficas (52).

Além de disbiose, pacientes do espectro do autismo possuem um aumento da permeabilidade intestinal (53,54), processo que possibilita que as endotoxinas e citocinas produzidas pela microbiota alcancem a corrente sanguínea, gerando também um estado imune-inflamatório de caráter sistêmico. Pacientes do TEA apresentam também danos nas junções de oclusão da mucosa intestinal, mesmo na ausência de outras desordens gastrintestinais (18,55). Essa diferença foi observada também em irmãos e familiares próximos dos pacientes, sugerindo que esse processo não é uma consequência do autismo, mas possivelmente uma causa, quando em combinação com outros fatores de risco.

Levando em conta os fatores que influenciam a composição da microbiota, principalmente na infância, estudos buscaram entender se existe ou não uma relação entre eles e o desenvolvimento do autismo. Em relação ao tipo de parto, não foi encontrada nenhuma evidência que prove que crianças nascidas por cesárea tivessem risco alterado de desenvolver autismo. Já no fator amamentação, um estudo observou que crianças com autismo vivenciam um período de amamentação materna relativamente menor (21). Além disso, mães que tiveram algum tipo de infecção durante a gestação e tiveram que ser hospitalizadas apresentaram maiores chances de carregarem filhos autistas, principalmente se houve infecção viral no

primeiro trimestre ou bacteriana no segundo trimestre de gestação (56). Todos esses dados, porém, são observacionais e não trazem evidências de uma relação causal entre distúrbios gastrintestinais e o autismo. Porém, a interação dos mediadores produzidos durante um quadro de disbiose com o SNC é conhecida e acredita-se que sejam um fator agravante para que crianças com predisposição genética ao autismo expressem o fenótipo ou que eles contribuam para um quadro mais severo da doença (52).

4.2.2 Interação da microbiota com o Sistema Nervoso Central e suas implicações para o autismo

Existem estudos demonstrando a correlação entre distúrbios gastrintestinais (e.g. Síndrome do Cólon Irritado e Doença Inflamatória Intestinal) com diversos transtornos neurais, desde os emocionais como os Transtornos de Humor (57) e o TDAH (58,59) até os degenerativos, como a Esclerose Múltipla (60) e a Neuromielite Óptica (61). Isso ocorre porque a microbiota mantém relações bidirecionais tanto com o SNC quanto com o sistema imune. As alterações emocionais e fisiológicas do cérebro são capazes de alterar a composição da microbiota através de diferentes mecanismos, como a regulação hormonal pela neuro-ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), a ativação vagal, ou a ativação simpática. O caminho inverso também ocorre por diferentes mecanismos. Para estudá-los, pesquisadores utilizam ratos livres de germes e os comparam a ratos com composição de microbiota normal, mas sem patógenos específicos (SPF), para assim conseguirem determinar o que se altera. Através desses estudos foi possível compreender que a forma mais simples pela qual ocorre a comunicação na via microbiota-SNC é através da produção de uma enorme gama de neurotransmissores por parte desses microorganismos (i.e. dopamina, norepinefrina, histamina, esteróides e endocanabinóides) (20).

Sudo et al., 2004 utilizaram esse modelo animal para avaliar a comunicação através do eixo HPA. Eles observaram que os ratos livres de germes apresentaram maiores níveis plasmáticos de hormônio corticotrófico (ACTH) e corticosterona, além de menores níveis de expressão do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) no córtex e no hipocampo. Para corrigir esse desequilíbrio, reconstituíram a microbiota dos animais livres de germes com fezes dos ratos SPF. Os autores observaram que a resposta exagerada do eixo HPA foi parcialmente revertida em

estágios mais tardios, apesar de não ter sido revertida em estágios mais avançados. Ou seja, além de demonstrarem que existe esse mecanismo, mostraram também a importância da microbiota no desenvolvimento do eixo-HPA para que ele seja suscetível à inibição por regulação neural (62).

Outro mecanismo de comunicação entre a microbiota intestinal e o SNC envolve a ativação vagal. Um estudo conduzido por Bravo et al., 2011 com o objetivo de verificar os efeitos da ingestão de cepas de *Lactobacillus* demonstrou que animais que ingeriram *L. rhamnosus* tiveram alterações significativas na expressão de receptores de ácido gama-aminobutírico (GABA), principal neurotransmissor inibitório do SNC. Houve redução na expressão de mRNA para esses receptores no córtex pré-frontal, na amígdala e no *locus coeruleus* e aumento de expressão em regiões corticais como o cíngulo e o pré-límbico. Esses efeitos, porém, não foram observados em animais vagotomizados, o que demonstra que a ativação do nervo vago foi responsável por essas alterações (63).

Além desses processos, um estudo conduzido por Erny et al., 2015 demonstrou que ocorre uma comunicação através dos ácidos graxos de cadeia-curta (AGCC), que são produtos ou metabólitos de bactérias que compõem a microbiota. Eles atuam como reguladores da maturação, morfologia e função da microglia, células que atuam como os macrófagos no SNC. Ratos livres de germes ou com microbiota reduzida apresentaram comprometimento na maturação e formato das células da microglia, levando a respostas iniciais defasadas por parte desse grupo celular aos patógenos. Erny e colaboradores também observaram que isso ocorria por ausência de expressão dos receptores de ácidos graxos livres 2 (FFAR2) para AGCC no SNC. (64). Por seu papel imune, a microglia também é regulada por fatores pró ou anti-inflamatórios e muitos deles atravessam a barreira hematoencefálica, como interferon-gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). Dessa forma, alterações na microbiota que provoquem resposta imune irão acabar regulando também a resposta neural (65).

Além dos processos mencionados, em situação de disbiose e aumento de permeabilidade intestinal, processos observados em maior extensão nos pacientes do TEA, metabólitos das bactérias como a endotoxina Lipopolissacarídeo (LPS) ultrapassem com maior facilidade a barreira intestinal e provocam um processo inflamatório (ou intensificam um já existente devido à disbiose), levando a uma elevação na produção de citocinas pró-inflamatórias. O LPS que consegue adentrar

a corrente sanguínea durante esse processo circula pelo corpo, atingindo a barreira hematoencefálica, onde interage com receptores do tipo 4 semelhante a toll (TLR-4), presentes nas células endoteliais, que são as células responsáveis pela integridade dessa barreira. Isso provoca o aumento de sua permeabilidade através de processos como aumento da endocitose e tráfego facilitado de células imunes, permitindo que o LPS chegue ao SNC, onde exerce papel modulador, principalmente em regiões ligadas ao controle emocional e na amígdala, região ligada ao aprendizado emocional e a processos cognitivos como memória e atenção (13) e com importante papel no desenvolvimento de outras estruturas cerebrais, como o córtex pré-frontal, regiões corticais sensoriais e o tálamo (66). Zheng et al. demonstraram um possível mecanismo envolvido nesse processo através da injeção de LPS na amígdala basolateral, o que provocou ativação da microglia e produção de citocinas pró-inflamatórias no local, além de causar um aumento na razão excitação/inibição por aumento da liberação pré-sináptica de glutamato (67). Além disso, as células endoteliais do cérebro, ao entrarem em contato com o LPS ou citocinas como interleucina 1 beta (IL-1 β) e TNF- α , passam elas mesmas a produzirem mediadores pró-inflamatórios, como prostaglandinas, leucotrienos, citocinas e quimiocinas. Esse processo ocorre para os dois lados da barreira, contribuindo, dessa forma, para a ativação da neuróglia e para o processo de neuroinflamação.

Em análises *post-mortem* de cérebros de crianças do espectro autista foi observada uma ativação aumentada de astrócitos e microglia em regiões específicas como o giro frontal medial, o giro cingulado e a massa branca do cerebelo (68), maiores concentrações de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, como IL-6 e TNF- α e presença elevada de infiltração linfocitária. Isso indica a presença de neuroinflamação mais expressiva, levantando a hipótese de que as alterações comportamentais observadas em pacientes com autismo podem ser agravadas pelos quadros inflamatórios gerados pelos distúrbios gastrintestinais.

4.2.3 Terapias para o TEA baseadas em modulação da microbiota intestinal

Tendo em vista as relações supracitadas, pesquisadores começaram a pensar na possibilidade de intervenções terapêuticas para modificar a composição da microbiota como uma forma de tratar ou amenizar os sintomas do autismo. A primeira alternativa testada foi o antibiótico vancomicina. Esse antibiótico não é absorvido pelo trato gastrintestinal, por isso se torna uma opção ideal para modificar

a microbiota Além disso, tem um amplo espectro contra microrganismos anaeróbios obrigatórios. Os testes clínicos demonstraram que houve uma melhora dos sintomas gastrintestinais e do TEA, mas que não perduraram após a interrupção do tratamento. Isso pode ser devido a falta de eficácia da vancomicina na eliminação de esporos, ao fato de ela eliminar bactérias benéficas ou ao fato de não haver cepas benéficas o suficiente para estabelecerem um equilíbrio e um ambiente saudável. Da mesma forma, o uso de prebióticos e probióticos também não se demonstrou eficiente na manutenção dos benefícios, pois são incapazes de gerar um novo equilíbrio (69). Foi então que começou a ser pensada a possibilidade de se realizar uma Terapia de Transplante de Microbiota (TTM) como forma de prolongar os efeitos do tratamento. Para isso, Kang et al., 2017 conduziram um estudo com 18 pacientes do espectro que passaram por um pré-tratamento de 2 semanas com antibióticos, seguido por uma lavagem intestinal e então a administração oral ou retal de uma alta dose inicial de Microbiota Intestinal Humana Padronizada seguida pela administração de doses diárias de manutenção durante 7 a 8 semanas. Visando melhorar a taxa de sobrevivência dos microrganismos transplantados, foi administrado paralelamente um supressor de ácido gástrico. Como resultado, observou-se uma redução de 80% dos sintomas gastrintestinais e 22% no escore CARS (*Childhood Autism Rating Scale*), uma escala que avalia os sintomas centrais do autismo, além de melhoras em sintomas como déficit de habilidade social, irritabilidade, letargia, hiperatividade e fala aberrante (21). Todos esses ganhos foram mantidos por um período de 8 semanas após o final do tratamento, e em uma segunda avaliação após 2 anos do procedimento, constatou-se que foi mantida apenas uma melhora de 26% dos sintomas gastrintestinais, mas que o escore CARS diminuiu mais ainda, chegando em 46% de redução (70). Esse estudo, porém, não foi conduzido de maneira randomizada, cega ou controlada por placebo, o que significa que ainda precisam ser realizados mais ensaios para que essa terapia seja de fato viável. Considerando o impacto e a limitação sociais que o TEA possui em pacientes e familiares, a melhora de sintomas constatada torna essa alternativa ainda muito promissora.

4.3 A relação da ocitocina com a microbiota intestinal no TEA

Um estudo conduzido por Tang et al., 2019 revelou que a ocitocina sistêmica exerce também um papel modulador em distúrbios gastrintestinais, aliviando a

inflamação. Isso ocorre através da ativação de dois mecanismos em macrófagos, células do sistema imune muito importantes para a instalação de quadros inflamatórios. Os macrófagos, ao receber estímulos pró ou anti-inflamatórios, se polarizam para o tipo M1 ou M2, respectivamente. Os macrófagos do tipo M1 amplificam a inflamação através da liberação de citocinas como IL-1 β , IL-6 e TNF- α e espécies reativas de oxigênio (EROs), causando danos teciduais e morte de microorganismos intracelulares. Essa polarização ocorre via sinalização por NF- κ B, um fator nuclear que tem sua ativação aumentada por fatores como o LPS, discutido previamente. Já os macrófagos do tipo M2, têm sua polarização dependente de vias interleucina 4/transdutor de sinal e ativador de transcrição 6 (IL-4/STAT6) e produzem citocinas anti-inflamatórias e garantem a integridade do epitélio. O estudo em questão revelou que a ocitocina é capaz de aumentar a expressão de beta-arrestina em macrófagos, que por sua vez, é responsável pela redução da sinalização por NF- κ B, diminuindo a polarização M1, ao mesmo tempo que promove a sinalização via IL-4 e STAT6, aumentando a polarização M2 e fazendo com que o equilíbrio homeostático seja restabelecido (71). Isso permite levantar uma correlação entre os baixos níveis de ocitocina e a elevada presença de distúrbios inflamatórios intestinais em pacientes do TEA, levantando a hipótese de uma possível interação benéfica entre a TTM e a administração intranasal de ocitocina, já utilizada para fins sistêmicos em estímulos ao trabalho de parto.

Outro ponto de intersecção entre as duas terapias aqui discutidas está nos baixos níveis de colesterol apresentados por pacientes do TEA (27). As lipoproteínas e o colesterol endógeno também têm seu metabolismo influenciado pela composição da microbiota (72). Como a estabilidade dos receptores de ocitocina depende da estabilidade da membrana lipídica e esta é diretamente ligada à presença de colesterol, uma nova correlação pode ser levantada a respeito da influência da composição da microbiota na sinalização ocitocinérgica como mecanismo contribuinte nas alterações de cognição e comportamento observadas nos pacientes com TEA. Dessa forma, pode haver outro benefício na interação entre as duas terapias abordadas, uma vez que o TTM poderia auxiliar na melhor eficácia da sinalização ocitocinérgica.

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O Transtorno do Espectro do Autismo representa um conjunto de doenças com grande impacto na cognição e comportamento sociais dos pacientes, além de trazer prejuízos na comunicação. Justamente por compreender um grupo de doenças de origens diversas, ainda não há uma completa compreensão sobre sua etiologia, o que acarreta em uma maior dificuldade de se estabelecer protocolos para diagnóstico e tratamentos. Nos últimos anos, muito vem sendo discutido a respeito da ocitocina e seus efeitos no SNC, o que a trouxe como foco de muitos estudos do TEA.

A ocitocina atua no organismo tanto como hormônio, quanto como neurotransmissor, sendo que as vias de síntese para cada uma dessas funções são independentes. Sua relevância no autismo se dá por seu papel como neurotransmissor, pois ela atua em regiões significativas para o desenvolvimento dos sintomas mais comuns como a conexão entre a rede de saliência e os córtices medial frontal e orbitofrontal e entre a rede de saliência e a rede de comportamento padrão, conexões em que a deficiência de sua sinalização acarreta, respectivamente, na dificuldade na compreensão de estímulos sociais e no processo de cognição social e auto-referência.

A resposta neural à ocitocina depende de sua concentração na região ou estrutura cerebral em questão, da quantidade de receptores presentes nos neurônios a serem estimulados e da afinidade entre ocitocina e receptor. Ainda não foram encontrados mecanismos que expliquem as alterações na concentração de ocitocina observadas nos pacientes do TEA, mas informações sobre os receptores podem contribuir significativamente para o estudo sobre a etiologia desses transtornos. A quantidade de receptores presentes na superfície celular pode ser afetada pelo padrão de metilação do promotor em seu gene codificador. Apesar de não se saber ainda o motivo, foram constatados padrões diferenciados de metilação do promotor no córtex pré-frontal de pacientes com TEA. Além disso, a estabilidade e, conseqüentemente, a afinidade destes receptores pelo ligante é dependente do colesterol, cujos níveis são muitas vezes mais baixos em pacientes do TEA. Nesse caso, uma hipótese aqui levantada é a de que esses baixos níveis de colesterol podem ser decorrentes de alterações na composição da microbiota intestinal, outro tema também discutido no trabalho.

Essas discussões acerca da ocitocina trouxeram grande expectativa para o desenvolvimento de um tratamento pautado na sua administração intranasal em pacientes do TEA. O que se verificou é que esse tratamento é bastante seguro e muito bem tolerado e que apresenta melhoras nos sintomas sociais, apesar de não ser eficiente no tratamento dos sintomas não sociais. As principais perspectivas para melhor eficácia desse tratamento estariam em facilitar sua permeabilidade à barreira hemato-encefálica e criar algum mecanismo de entrega que pudesse selecionar as estruturas cerebrais de interesse.

Paralelamente à ocitocina, a microbiota intestinal também começou a ganhar bastante destaque para os estudos de autismo, graças à constatação de elevada incidência de sintomas do trato gastrointestinal e de alterações na composição dessa microbiota nos pacientes do TEA. Apesar de estudos observacionais correlacionarem alguns dos fatores que influenciam a formação da microbiota ao longo dos primeiros anos de vida com a incidência de autismo em alguns bebês, não existem dados comprovando alguma relação causal entre a presença desses distúrbios e o desenvolvimento do TEA. O que acredita-se é que eles podem agravar os sintomas do TEA ou levarem um indivíduo com pré-disposição genética a de fato manifestar algum transtorno.

O principal mecanismo pelo qual a microbiota poderia contribuir para a sintomatologia do TEA por mediação do sistema imune. A alteração na síntese de ácidos graxos de cadeia-curta e a resposta imune local geram aumento na permeabilidade gastrointestinal, levando à corrente sanguínea diversos metabólitos, endotoxinas e citocinas que, ao atingir o SNC, provocam a neuroinflamação observada nos pacientes o espectro do autismo e consequentes alterações no neurodesenvolvimento e na neurotransmissão.

As intervenções terapêuticas pautadas nessa correlação estão começando a ganhar força e se tornando alternativas bastante promissoras. A Terapia de Transplante de Microbiota ainda está nos seus primeiros testes clínicos, mas se demonstrou eficaz não só na redução dos sintomas gastrointestinais, como também na cognição social e na comunicação. A principal vantagem dessa terapia reside no fato de ter efeitos duradouros, além de uma progressão da melhora nos sintomas do autismo com o passar do tempo. Porém, essa abordagem ainda precisa passar por mais ensaios clínicos para ter sua eficácia comprovada e se torne, de fato, uma alternativa.

Por fim, o trabalho trouxe novas perspectivas com relação ao tratamento no autismo no que diz respeito à possibilidade de combinar as duas intervenções terapêuticas aqui descritas. A alteração na composição da microbiota pode aumentar a sinalização ocitocinérgica através da regulação dos níveis de colesterol e consequentemente maior estabilidade dos receptores. Paralelamente, a administração de intranasal de ocitocina pode auxiliar na redução de inflamação gastrointestinal, auxiliando no sucesso e durabilidade dos efeitos da TTM.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bhandari R, Paliwal JK, Kuhad A. Neuropsychopathology of autism spectrum disorder: complex interplay of genetic, epigenetic, and environmental factors. *Adv Neurobiol.* 2020;24:97–141.
2. Messent P. DSM-5. *Clin Child Psychol Psychiatry.* 2013 Oct;18(4):479–82.
3. Transtorno do espectro autista - OPAS/OMS | Organização Pan-Americana da Saúde [Internet]. [cited 2021 May 30]. Available from: <https://www.paho.org/pt/topicos/transtorno-do-espectro-autista>
4. Deutsch SI, Raffaele CT. Understanding facial expressivity in autism spectrum disorder: An inside out review of the biological basis and clinical implications. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2019 Jan 10;88:401–17.
5. Al-Dewik N, Al-Jurf R, Styles M, Tahtamouni S, Alsharshani D, Alsharshani M, et al. Overview and introduction to autism spectrum disorder (ASD). *Adv Neurobiol.* 2020;24:3–42.
6. Steinman G. IGF - Autism prevention/amelioration. *Med Hypotheses.* 2019 Jan;122:45–7.
7. Steinman G. Predicting autism at birth. *Med Hypotheses.* 2013 Jul;81(1):21–5.
8. Steinman G, Mankuta D. Molecular biology of autism's etiology - An alternative mechanism. *Med Hypotheses.* 2019 Sep;130:109272.
9. Steinman G. Plausible etiology of brain dysconnectivity in autism - Review and prospectus. *Med Hypotheses.* 2015 Oct;85(4):405–7.
10. Steinman G, Mankuta D. Insulin-like growth factor and the etiology of autism. *Med Hypotheses.* 2013 Apr;80(4):475–80.
11. Janusonis S, Gluncic V, Rakic P. Early serotonergic projections to Cajal-Retzius cells: relevance for cortical development. *J Neurosci.* 2004 Feb 18;24(7):1652–9.
12. Chugani DC. Serotonin in autism and pediatric epilepsies. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev.* 2004;10(2):112–6.
13. Gallagher M, Chiba AA. The amygdala and emotion. *Curr Opin Neurobiol.* 1996 Apr;6(2):221–7.
14. Li Y, Zhong W, Wang D, Feng Q, Liu Z, Zhou J, et al. Serotonin neurons in the dorsal raphe nucleus encode reward signals. *Nat Commun.* 2016 Jan 28;7:10503.
15. Morales M, Margolis EB. Ventral tegmental area: cellular heterogeneity, connectivity and behaviour. *Nat Rev Neurosci.* 2017 Jan 5;18(2):73–85.
16. Modahl C, Green L, Fein D, Morris M, Waterhouse L, Feinstein C, et al. Plasma

- oxytocin levels in autistic children. *Biol Psychiatry*. 1998 Feb 15;43(4):270–7.
17. Marler S, Ferguson BJ, Lee EB, Peters B, Williams KC, McDonnell E, et al. Association of Rigid-Compulsive Behavior with Functional Constipation in Autism Spectrum Disorder. *J Autism Dev Disord*. 2017;47(6):1673–81.
 18. Srikantha P, Mohajeri MH. The Possible Role of the Microbiota-Gut-Brain-Axis in Autism Spectrum Disorder. *Int J Mol Sci*. 2019 Apr 29;20(9).
 19. Kohane IS, McMurry A, Weber G, MacFadden D, Rappaport L, Kunkel L, et al. The co-morbidity burden of children and young adults with autism spectrum disorders. *PLoS ONE*. 2012 Apr 12;7(4):e33224.
 20. Strandwitz P. Neurotransmitter modulation by the gut microbiota. *Brain Res*. 2018 Aug 15;1693(Pt B):128–33.
 21. Kang D-W, Adams JB, Gregory AC, Borody T, Chittick L, Fasano A, et al. Microbiota Transfer Therapy alters gut ecosystem and improves gastrointestinal and autism symptoms: an open-label study. *Microbiome*. 2017 Jan 23;5(1):10.
 22. Huang Y, Huang X, Ebstein RP, Yu R. Intranasal oxytocin in the treatment of autism spectrum disorders: A multilevel meta-analysis. *Neurosci Biobehav Rev*. 122:18–27.
 23. Sundaram SM, Schwaninger M. Parvocellular oxytocin neurons and autism spectrum disorders. *Trends Endocrinol Metab*. 2021 Apr;32(4):195–7.
 24. Gimpl G, Fahrenholz F. The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation. *Physiol Rev*. 2001 Apr;81(2):629–83.
 25. Jurek B, Neumann ID. The oxytocin receptor: from intracellular signaling to behavior. *Physiol Rev*. 2018 Jul 1;98(3):1805–908.
 26. Lewis EM, Stein-O'Brien GL, Patino AV, Nardou R, Grossman CD, Brown M, et al. Parallel social information processing circuits are differentially impacted in autism. *Neuron*. 2020 Nov 25;108(4):659-675.e6.
 27. Busnelli M, Chini B. Molecular basis of oxytocin receptor signalling in the brain: what we know and what we need to know. *Curr Top Behav Neurosci*. 2018;35:3–29.
 28. Gottlieb MM. Pitocin and autism: An analysis of oxytocin receptor desensitization in the fetus. *Behav Brain Res*. 2016 Feb 1;298(Pt B):246–7.
 29. Kimura T, Saji F, Nishimori K, Ogita K, Nakamura H, Koyama M, et al. Molecular regulation of the oxytocin receptor in peripheral organs. *J Mol Endocrinol*. 2003 Apr;30(2):109–15.
 30. Kimura T, Tanizawa O, Mori K, Brownstein MJ, Okayama H. Structure and expression of a human oxytocin receptor. *Nature*. 1992 Apr 9;356(6369):526–9.

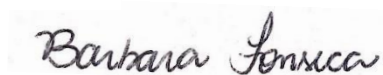
31. Kubota Y, Kimura T, Hashimoto K, Tokugawa Y, Nobunaga K, Azuma C, et al. Structure and expression of the mouse oxytocin receptor gene. *Mol Cell Endocrinol*. 1996 Nov 29;124(1–2):25–32.
32. Choi J-W, Kang S-M, Lee Y, Hong S-H, Sanek NA, Young WS, et al. MicroRNA profiling in the mouse hypothalamus reveals oxytocin-regulating microRNA. *J Neurochem*. 2013 Aug;126(3):331–7.
33. Renthal NE, Chen C-C, Williams KC, Gerard RD, Prange-Kiel J, Mendelson CR. miR-200 family and targets, ZEB1 and ZEB2, modulate uterine quiescence and contractility during pregnancy and labor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010 Nov 30;107(48):20828–33.
34. Gregory SG, Connelly JJ, Towers AJ, Johnson J, Biscocho D, Markunas CA, et al. Genomic and epigenetic evidence for oxytocin receptor deficiency in autism. *BMC Med*. 2009 Oct 22;7:62.
35. Jiang X, Ma X, Geng Y, Zhao Z, Zhou F, Zhao W, et al. Intrinsic, dynamic and effective connectivity among large-scale brain networks modulated by oxytocin. *Neuroimage*. 2021 Feb 15;227:117668.
36. Young LJ, Wang Z. The neurobiology of pair bonding. *Nat Neurosci*. 2004 Oct;7(10):1048–54.
37. Kosfeld M, Heinrichs M, Zak PJ, Fischbacher U, Fehr E. Oxytocin increases trust in humans. *Nature*. 2005 Jun 2;435(7042):673–6.
38. Alvares GA, Quintana DS, Whitehouse AJO. Beyond the hype and hope: Critical considerations for intranasal oxytocin research in autism spectrum disorder. *Autism Res*. 2017 Jan;10(1):25–41.
39. Goel R, Hong JS, Findling RL, Ji NY. An update on pharmacotherapy of autism spectrum disorder in children and adolescents. *Int Rev Psychiatry*. 2018 Apr 25;30(1):78–95.
40. Guastella AJ, Hickie IB. Oxytocin treatment, circuitry, and autism: A critical review of the literature placing oxytocin into the autism context. *Biol Psychiatry*. 2016 Feb 1;79(3):234–42.
41. Okamoto Y, Ishitobi M, Wada Y, Kosaka H. The potential of nasal oxytocin administration for remediation of autism spectrum disorders. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2016;15(5):564–77.
42. Lee SY, Lee AR, Hwangbo R, Han J, Hong M, Bahn GH. Is Oxytocin Application for Autism Spectrum Disorder Evidence-Based? *Exp Neurobiol*. 2015 Dec 16;24(4):312–24.
43. Ooi YP, Weng S-J, Kossowsky J, Gerger H, Sung M. Oxytocin and Autism Spectrum Disorders: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Pharmacopsychiatry*. 2017 Jan;50(1):5–13.
44. Cai Q, Feng L, Yap KZ. Systematic review and meta-analysis of reported

- adverse events of long-term intranasal oxytocin treatment for autism spectrum disorder. *Psychiatry Clin Neurosci*. 2018 Mar;72(3):140–51.
45. Milani C, Duranti S, Bottacini F, Casey E, Turrone F, Mahony J, et al. The first microbial colonizers of the human gut: composition, activities, and health implications of the infant gut microbiota. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2017 Nov 8;81(4).
 46. Weiss GA, Hennot T. Mechanisms and consequences of intestinal dysbiosis. *Cell Mol Life Sci*. 2017 Mar 28;74(16):2959–77.
 47. Ursell LK, Clemente JC, Rideout JR, Gevers D, Caporaso JG, Knight R. The interpersonal and intrapersonal diversity of human-associated microbiota in key body sites. *J Allergy Clin Immunol*. 2012 May;129(5):1204–8.
 48. Neu J. The microbiome during pregnancy and early postnatal life. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2016 Jun 8;21(6):373–9.
 49. Rodríguez JM, Murphy K, Stanton C, Ross RP, Kober OI, Juge N, et al. The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life. *Microb Ecol Health Dis*. 2015 Feb 2;26:26050.
 50. Bokulich NA, Chung J, Battaglia T, Henderson N, Jay M, Li H, et al. Antibiotics, birth mode, and diet shape microbiome maturation during early life. *Sci Transl Med*. 2016 Jun 15;8(343):343ra82.
 51. Palmer C, Bik EM, DiGiulio DB, Relman DA, Brown PO. Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biol*. 2007 Jul;5(7):e177.
 52. de Theije CGM, Wu J, da Silva SL, Kamphuis PJ, Garssen J, Korte SM, et al. Pathways underlying the gut-to-brain connection in autism spectrum disorders as future targets for disease management. *Eur J Pharmacol*. 2011 Sep;668 Suppl 1:S70-80.
 53. de Magistris L, Familiari V, Pascotto A, Sapone A, Froli A, Iardino P, et al. Alterations of the intestinal barrier in patients with autism spectrum disorders and in their first-degree relatives. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2010 Oct;51(4):418–24.
 54. D'Eufemia P, Celli M, Finocchiaro R, Pacifico L, Viozzi L, Zaccagnini M, et al. Abnormal intestinal permeability in children with autism. *Acta Paediatr*. 1996 Sep;85(9):1076–9.
 55. van De Sande MMH, van Buul VJ, Brouns FJPH. Autism and nutrition: the role of the gut-brain axis. *Nutr Res Rev*. 2014 Dec;27(2):199–214.
 56. Madore C, Leyrolle Q, Lacabanne C, Benmamar-Badel A, Joffre C, Nadjar A, et al. Neuroinflammation in autism: plausible role of maternal inflammation, dietary omega 3, and microbiota. *Neural Plast*. 2016 Oct 20;2016:3597209.
 57. Chang HY, Seo J-H, Kim HY, Kwon J-W, Kim B-J, Kim HB, et al. Allergic diseases in preschoolers are associated with psychological and behavioural

- problems. *Allergy Asthma Immunol Res.* 2013 Sep;5(5):315–21.
58. Gillies D, Sinn JK, Lad SS, Leach MJ, Ross MJ. Polyunsaturated fatty acids (PUFA) for attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) in children and adolescents. *Cochrane Database Syst Rev.* 2012 Jul 11;(7):CD007986.
 59. de Theije CGM, Bavelaar BM, Lopes da Silva S, Korte SM, Olivier B, Garssen J, et al. Food allergy and food-based therapies in neurodevelopmental disorders. *Pediatr Allergy Immunol.* 2014 May;25(3):218–26.
 60. Berer K, Mues M, Koutrolos M, Rasbi ZA, Boziki M, Johner C, et al. Commensal microbiota and myelin autoantigen cooperate to trigger autoimmune demyelination. *Nature.* 2011 Oct 26;479(7374):538–41.
 61. Banati M, Csecsei P, Koszegi E, Nielsen HH, Suto G, Bors L, et al. Antibody response against gastrointestinal antigens in demyelinating diseases of the central nervous system. *Eur J Neurol.* 2013 Nov;20(11):1492–5.
 62. Sudo N, Chida Y, Aiba Y, Sonoda J, Oyama N, Yu X-N, et al. Postnatal microbial colonization programs the hypothalamic-pituitary-adrenal system for stress response in mice. *J Physiol (Lond).* 2004 Jul 1;558(Pt 1):263–75.
 63. Bravo JA, Forsythe P, Chew MV, Escaravage E, Savignac HM, Dinan TG, et al. Ingestion of *Lactobacillus* strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011 Sep 20;108(38):16050–5.
 64. Erny D, Hrabě de Angelis AL, Jaitin D, Wieghofer P, Staszewski O, David E, et al. Host microbiota constantly control maturation and function of microglia in the CNS. *Nat Neurosci.* 2015 Jul;18(7):965–77.
 65. Boche D, Perry VH, Nicoll JAR. Review: activation patterns of microglia and their identification in the human brain. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2013 Feb;39(1):3–18.
 66. Mangiola F, Ianiro G, Franceschi F, Fagioli S, Gasbarrini G, Gasbarrini A. Gut microbiota in autism and mood disorders. *World J Gastroenterol.* 2016 Jan 7;22(1):361–8.
 67. Zheng Z-H, Tu J-L, Li X-H, Hua Q, Liu W-Z, Liu Y, et al. Neuroinflammation induces anxiety- and depressive-like behavior by modulating neuronal plasticity in the basolateral amygdala. *Brain Behav Immun.* 2021 Jan;91:505–18.
 68. Vargas DL, Nascimbene C, Krishnan C, Zimmerman AW, Pardo CA. Neuroglial activation and neuroinflammation in the brain of patients with autism. *Ann Neurol.* 2005 Jan;57(1):67–81.
 69. Adams JB, Borody TJ, Kang D-W, Khoruts A, Krajmalnik-Brown R, Sadowsky MJ. Microbiota transplant therapy and autism: lessons for the clinic. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* 2019 Nov 7;13(11):1033–7.
 70. Kang D-W, Adams JB, Coleman DM, Pollard EL, Maldonado J, McDonough-

- Means S, et al. Long-term benefit of Microbiota Transfer Therapy on autism symptoms and gut microbiota. *Sci Rep.* 2019 Apr 9;9(1):5821.
71. Tang Y, Shi Y, Gao Y, Xu X, Han T, Li J, et al. Oxytocin system alleviates intestinal inflammation by regulating macrophages polarization in experimental colitis. *Clin Sci.* 2019 Sep 30;133(18):1977–92.
72. Villette R, Kc P, Beliard S, Salas Tapia MF, Rainteau D, Guerin M, et al. Unraveling Host-Gut Microbiota Dialogue and Its Impact on Cholesterol Levels. *Front Pharmacol.* 2020 Apr 3;11:278.

16/06/2021



Barbara de Carvalho Simões da Fonseca
Aluna

16/06/2021



Helder Takashi Imoto Nakaya
Orientador