

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA

MÁRCIA HELENA FÁVERO DE SOUZA TOSTES

**FATORES IMUNOBIOLÓGICOS E PERFIL DE DESENVOLVIMENTO
NO AUTISMO INFANTIL**

Juiz de Fora
2012

MÁRCIA HELENA FÁVERO DE SOUZA TOSTES

**FATORES IMUNOBIOLOGÍCOS E PERFIL DE DESENVOLVIMENTO
NO AUTISMO INFANTIL**

Tese de doutorado apresentada ao curso de Doutorado do Programa de pós-graduação em Saúde-Área de concentração em Saúde Brasileira da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Saúde

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Nádia Rezende Barbosa Raposo

Co-orientador: Prof. Dr. Henrique Couto Teixeira

Juiz de Fora
2012

Tostes, Márcia Helena Fávero de Souza.

Fatores imunobiológicos e perfil de desenvolvimento no autismo infantil
/ Márcia Helena Fávero de Souza Tostes. – 2012.
89 f. : il.

Tese (Doutorado em Saúde)–Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz
de Fora, 2012.

1. Autismo. 2. Oxido nítrico. 3. Citocinas. I. Título.

CDU 616.89-008.42:616-053.2

Dedico esse trabalho a Rômulo e Alexandre, meus filhos, minha vida. A Maria das Graças e Adilson, meus pais, pelo apoio de toda a vida. Aos pais das crianças que participaram do estudo, pela esperança!

AGRADECIMENTOS

À Prof^ª. Nádia Rezende Barbosa Raposo, pela orientação segura e disponibilidade em compartilhar seu conhecimento.

Ao Prof. Henrique Couto Teixeira, por sua colaboração em diversos momentos da execução do trabalho.

Ao Prof. Wagner Farid Gattaz pela contribuição na confecção do artigo.

À Rosemeri Mendes pela disponibilidade e cuidado na condução da avaliação neuropsicológica.

À Fátima Cristina Frizeiro pela determinação e carinho no contato direto com as crianças durante os procedimentos técnicos.

Ao Alexandre Alberto Mendes Tostes pelo apoio e compreensão.

Aos colegas Dr. César Augusto Souza Lima de Mello, Dr. Márcio José de Moraes Oliveira, Dr^a. Wânia Dantas Meyer e Rosane Jacques Rodrigues, pela colaboração fundamental no encaminhamento das crianças atendidas no CAPS-IIJ.

À Prof^ª. Darcília Maria Nagen da Costa pela disponibilidade e contribuições.

Aos profissionais da FIAINE, das APAES de Juiz de Fora, Rio Pomba, Muriaé e Ubá e da Escola Estadual Maria das Dores pelo interesse e contribuição participativa em todas as etapas do trabalho.

Aos profissionais da Escola Estadual Fernando Lobo e Escola SESC- Espaço livre, pela confiança em me receber em suas instituições.

RESUMO

O autismo infantil é um transtorno do desenvolvimento, definido pelo déficit na interação social, alterações da comunicação e padrões limitados de comportamentos. Alterações imunológicas, no metabolismo de fosfolípidos de membrana e no estresse oxidativo estão subjacentes. Este trabalho avaliou os níveis dos marcadores de ativação imunológica, de fosfolípidos de membrana e de óxido nítrico em 24 crianças autistas, pareadas por idade e sexo com crianças saudáveis, e investigou a variação desses níveis em crianças autistas com diferentes perfis de desenvolvimento. Após a avaliação psiquiátrica, as amostras de sangue foram coletadas e submetidas à análise de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ , TNF- α por citometria de fluxo, à análise de fosfolipase A₂ por ensaio fluorimétrico, à análise de fosfolípidos por cromatografia gasosa e à determinação do óxido nítrico pelo método de Griess. A escala de desenvolvimento do perfil psicoeducacional revisado (PEP-R) foi aplicada. Os dados foram analisados estatisticamente (ANOVA e teste *post hoc* de *Bonferroni*) com auxílio do SPSS versão 13. Os níveis plasmáticos de IFN- γ e óxido nítrico foram significativamente elevados entre as crianças autistas em comparação com o grupo controle. A atividade de fosfolipase A₂ e os níveis plasmáticos de ácido araquidônico estavam elevados, enquanto os de ácidos eicosapentaenóico e docosahexaenóico estavam reduzidos entre as crianças autistas. Os escores obtidos no PEP-R diferiram significativamente nos dois grupos, mas não houve correlação com os resultados das dosagens laboratoriais. A análise conjunta de dados sugere uma associação do estresse oxidativo com desregulação imune e alteração do metabolismo lipídico no autismo infantil.

Palavras-chave: Transtorno autístico. Citocinas. Fosfolípidos. Óxido nítrico. Identificação (Psicologia).

ABSTRACT

Autism in children is a developmental disorder defined by deficits in social interaction, impaired communication and limitations in the standard behavior. There are also immunological changes, in metabolism of membrane phospholipids and in oxidative stress. This study evaluated the levels of the immune activators markers from membrane phospholipids and nitric oxide in 24 autistic children, matched for age and sex with healthy children. This study also investigated the variation of these levels in children with autism with different development profiles. After psychiatric evaluation, blood samples were collected and subjected to analysis of IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ , TNF- α by flow cytometry, to analysis of phospholipase A2 by fluorimetric analysis, to analysis of phospholipids by gas chromatograph and to determination of nitric oxide by the Griess method. The scale of the development of psychoeducational profile revised (PEP-R) was applied. Data were statistically analyzed (ANOVA and post hoc Bonferroni test) using SPSS version13. Plasma levels of IFN- γ and nitric oxide were significantly higher among children with autism compared with the control group. The activity of phospholipase A2 and plasma levels of arachidonic acid were elevated, whereas eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid were reduced among children with autism. The scores obtained in the PEP-R differed significantly between the two groups, but no correlation with the results of laboratory measurements was found. The joint analysis of data suggests an association of oxidative stress with immune dysregulation and alteration of lipid metabolism in infantile autism.

Keywords: Autistic disorder. Cytokines. Phospholipids. Nitric oxide. Identification (Psychology).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Diagrama com a formação do grupo de pacientes.....	39
Figura 2 Diagrama com a formação do grupo controle.....	40

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 Pontuação obtida pelos indivíduos pertencentes aos grupos controle e de pacientes autistas nas escalas de desenvolvimento do PEP-R	46
Gráfico 2 Níveis plasmáticos de ARA, EPA e DHA nos grupos controle e de pacientes autistas	50
Gráfico 3 Níveis plasmáticos de PLA2 nos grupos controle e de pacientes autistas	51
Gráfico 4 Níveis plasmáticos de NO nos grupos controle e de pacientes autistas	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Dados demográficos dos participantes do estudo.....	45
Tabela 2	Parâmetros psicométricos dos indivíduos pertencentes aos grupos controle e de pacientes autistas.....	47
Tabela 3	Níveis séricos de citocinas nos grupos controle e de pacientes autistas.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS

A β	beta amilóide
ALA	ácido α -linoléico
APP	proteína precursora do amilóide
ARA	ácido araquidônico
cPLA ₂	fosfolipase citosólica dependente de cálcio
DA	doença de <i>Alzheimer</i>
DHA	ácido docohexaenóico
DNA	ácido desoxiribonucléico
DSM-III	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Third Edition
DSM-IV	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Edition
DSM-IV-TR	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Edition, Text Revision
ECT	Eletroconvulsoterapia
EPA	ácido eicosapentaenóico
ID	idade de desenvolvimento
IFN- γ	interferon gama
IL	Interleucina
HPLC	cromatografia líquida de alta eficiência
LA	ácido linoléico
MAPK	proteína quinase ativada por mitógeno
PAF	fator de ativação de plaquetas

PEP-R	perfil psicoeducacional revisado
PLA ₂	fosfolipase A ₂
³¹ P-MRS	espectroscopia de ressonância magnética do fósforo 31
PUFA	ácidos graxos poli-insaturados
QD	quociente de desenvolvimento
QI	quociente intelectual
SNC	sistema nervoso central
TGD	transtornos globais do desenvolvimento
TID	transtorno invasivos do desenvolvimento
TNF- α	fator de necrose tumoral alfa

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1	HISTÓRICO.....	16
2.2	CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E DIAGNÓSTICO.....	17
2.3	CURSO E PROGNÓSTICO.....	19
2.4	DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL.....	20
2.5	TRATAMENTO.....	21
2.6	FATORES GENÉTICOS.....	22
2.7	RESPOSTA IMUNE E CITOCINAS	24
2.7.1	Aspectos imunológicos envolvidos no autismo infantil	25
2.8	METABOLISMO DE FOSFOLÍPIDES E TRANSTORNOS NEUROPSIQUIÁTRICOS	27
2.8.1	Esquizofrenia	29
2.8.2	Transtornos do humor	30
2.8.3	Epilepsia	31
2.8.4	Doença de Alzheimer (DA)	32
2.8.5	Transtornos mentais da infância	33
2.9	ESTRESSE OXDATIVO NO AUTISMO INFANTIL	35
3	HIPÓTESE	37
4	OBJETIVOS	37
4.1	GERAL	37
4.2	ESPECÍFICOS	37
5	MATERIAL E MÉTODOS	38
5.1	CASUÍSTICA.....	38
5.2	COLETA DE SANGUE	41
5.3	ANÁLISES LABORATORIAIS	41
5.3.1	Determinação de citocinas	41
5.3.2	Determinação dos ácidos graxos	42

5.3.3	Determinação de PLA ₂	42
5.3.4	Determinação de óxido nítrico	43
5.4	AVALIAÇÃO NEUROPSICOLÓGICA	43
5.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	44
5.6	ASPECTOS ÉTICOS.....	44
6	RESULTADOS	45
6.1	CASUÍSTICA	45
6.2	PARÂMETROS PSICOMÉTRICOS	46
6.3	ANÁLISES LABORATORIAIS	48
6.3.1	Dosagem de citocinas	48
6.3.2	Quantificação de Ácidos graxos por cromatografia gasosa.....	49
6.3.3	Dosagem de PLA ₂	51
6.3.4	Dosagem de óxido nítrico.....	51
7	DISCUSSÃO	53
8	CONCLUSÃO	59
	REFERÊNCIAS	60
	APÊNDICE	72
	ANEXOS	73

1 INTRODUÇÃO

O autismo é um transtorno do desenvolvimento, definido pelo déficit na interação social recíproca e na comunicação, e pela presença de um repertório restrito e repetitivo de comportamentos, atividades e interesses, iniciando usualmente na infância, antes dos três anos de idade (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2000). Também denominado como transtorno autístico, autismo infantil e autismo infantil precoce é classificado como um dos transtornos globais (ou invasivos) do desenvolvimento (TGD), grupo de transtornos caracterizados pelo início precoce de atrasos e desvios no desenvolvimento das habilidades sociais, comunicativas e demais habilidades. A categoria dos TGD inclui condições associadas ou não ao retardo mental e com uma ampla variedade de apresentações clínicas, ocorrendo tanto em relação ao perfil da sintomatologia, quanto ao grau de acometimento, mas agrupadas por apresentarem uma interrupção precoce nos processos de socialização (KLIN, 2006). Embora a validade do autismo, como um conceito diagnóstico, tenha sido bem estabelecida, a validade e definição de outros TGD permanecem controversas.

O termo “transtornos do espectro do autismo” também tem sido utilizado para agrupar condições distintas como autismo, síndrome de Asperger e TGD - sem outra especificação. Embora associadas a manifestações comportamentais heterogêneas, com diferentes graus de acometimento e mesmo múltiplos fatores etiológicos, essas condições caracterizam os transtornos do desenvolvimento mais fortemente associados a fatores genéticos (VOLKMAR et al., 2004; RUTTER, 2005).

Entre os vários TGDs, o autismo tem sido o mais amplamente estudado, mas vários fatores, que caracterizam a heterogeneidade da síndrome, têm gerado problemas para o estabelecimento de medições precisas dos déficits característicos: ampla faixa de expressão da síndrome, mudanças na expressão da síndrome com a idade, frequência de sintomas tipo-autistas em indivíduos com grave retardo mental e infrequência relativa do transtorno (VOLKMAR; COHEN, 1988).

Os estudos epidemiológicos realizados têm revelado um aumento significativo na identificação dos indivíduos com autismo nas últimas décadas. O primeiro estudo realizado em 1966, por Victor Lotter relatou uma prevalência de 4,5 para cada 10.000 crianças de 8 a 10 anos em um condado de Londres. Após cerca de quatro décadas, o estudo de Fombonne (2005) relatou

um índice de aproximadamente um indivíduo com autismo em cada 1000 nascimentos, com maior incidência em meninos.

As possíveis razões para o grande aumento na prevalência do autismo são: 1) a adoção de definições mais amplas de autismo; 2) maior conscientização dos clínicos sobre as manifestações do autismo; 3) melhor detecção de casos sem retardo mental; 4) o incentivo para que se determine um diagnóstico; 5) a compreensão sobre a identificação precoce relacionando-se a um melhor prognóstico; 6) a investigação com base populacional (KLIN, 2006). Assim, o aumento da identificação de indivíduos que apresentam essa condição tem impulsionado os pesquisadores a buscar a elucidação de fatores associados à fisiopatologia do autismo.

O início precoce, o perfil de sintomas e a cronicidade do transtorno sugerem que mecanismos biológicos formem a base do processo (KLIN et al., 2002). Está claro que fatores genéticos, epigenéticos e ambientais resultam em alterações do neurodesenvolvimento, que conferem vulnerabilidade ao autismo (HERTZ-PICCIOTTO, 2006; PERSICO; BOURGERON, 2006). No entanto, a heterogeneidade própria dos transtornos do espectro do autismo tem sido apontada como uma dificuldade para a elucidação de fatores neurobiológicos subjacentes. Não está claro se o autismo seria uma síndrome que varia em gravidade, mas com uma base neural comum, ou se os transtornos do espectro do autismo têm várias etiologias e afetam vários sistemas cerebrais, levando aos sintomas nucleares (LORD et al., 2000).

Dentre os fatores subjacentes destacam-se:

- alterações no sistema imunológico como deficiência ou auto-imunidade;
- alterações no metabolismo de fosfolípides de membrana, com sinais de deficiência de ácidos graxos poliinsaturados, em associação com aumento do estresse oxidativo;
- relação entre menor capacidade cognitiva e pior evolução.

Como os sinais de deficiência de ácidos graxos estão associados com déficits mais severos na aprendizagem em crianças com dislexia (RICHARDSON et al., 2000), a investigação de tal associação nas crianças autistas poderia contribuir para um maior conhecimento deste modelo complexo.

Considerando que a associação entre os fatores subjacentes acima mencionados não foram correlacionados nas avaliações de crianças autistas, este trabalho objetivou investigar se haveria uma associação entre os parâmetros imunológicos, o metabolismo de fosfolípides e os déficits do desenvolvimento no autismo infantil.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 HISTÓRICO

Durante o século passado, foram propostos vários conceitos para a “psicose infantil”, inicialmente procurando estender às crianças a descrição de demência precoce. Com a suposição de haver continuidade entre os transtornos psiquiátricos severos na infância e esquizofrenia na idade adulta, o termo esquizofrenia infantil tornou-se sinônimo de psicose infantil.

Em 1943, Leo Kanner descreveu 11 casos de “autismo infantil precoce”, enfatizando a predominância dos déficits de relacionamento social, assim como de comportamentos incomuns.

Durante os anos 50 e 60, seguiram-se muitas hipóteses relacionadas à etiologia do autismo, sendo que a mais discutida referia-se ao autismo causado por pais não responsivos emocionalmente aos seus filhos, com práticas desviantes na criação dos mesmos. Tais hipóteses foram progressivamente abandonadas ao mesmo tempo em que muitas evidências sugeriam que o autismo era um transtorno cerebral, que ocorria independentemente da dinâmica familiar investigada.

Em 1978, Michael Rutter definiu o autismo com base em quatro critérios: 1) atrasos e desvios sociais, não só em função do retardo mental; 2) problemas de comunicação, não só em função do retardo mental; 3) comportamentos incomuns, como maneirismos e estereotípias e 4) início antes dos 30 meses de idade.

Com a influência da definição de Rutter (1978), o autismo foi reconhecido no *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Third Edition*- DSM-III (APA, 1980) como pertencente a uma nova classe de transtornos: os transtornos invasivos do desenvolvimento (TID), termo escolhido para indicar que múltiplas áreas de funcionamento estariam afetadas. Em seguida, o termo TID foi adotado também pela Classificação Estatística Internacional de Doenças e Problemas Relacionados à Saúde, na sua décima revisão- CID-10 (WHO, 1993). Posteriormente, os sistemas de classificação do *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Edition* -DSM-IV (APA, 1994) e da CID-10 tiveram as definições de suas terminologias tornadas equivalentes, não havendo alteração dos mesmos no *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Edition, Text Revision*-DSM-IV-TR (APA, 2000).

2.2 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E DIAGNÓSTICO

O DSM-IV-TR oferece uma série de 16 critérios para o transtorno autista, agrupados em três categorias (comprometimento qualitativo da interação social, comprometimento qualitativo da comunicação e padrões restritos e repetitivos de comportamentos, atividades e interesses). Para a realização do diagnóstico devem se apresentar um total de seis ou mais critérios, sendo pelo menos dois da primeira categoria e um de cada uma das outras.

No grupo “comprometimento qualitativo na interação social” há quatro critérios, incluindo prejuízo marcado no uso de formas não-verbais de comunicação e interação social; fracasso em desenvolver relacionamento com seus pares; ausência de tentativas de compartilhar prazer e interesses; e ausência de reciprocidade social ou emocional. Os critérios indicadores de “comprometimento qualitativo da comunicação” incluem atrasos no desenvolvimento da linguagem verbal; prejuízo na capacidade de iniciar ou manter uma conversa; uso estereotipado e repetitivo da linguagem; e ausência de jogos ou brincadeiras de imitação social. Para o grupo de “padrões restritos e repetitivos de comportamento, interesses e atividades” são indicados preocupação insistente com padrões estereotipados e restritos de interesses; adesão inflexível a rotinas e rituais; maneirismos motores estereotipados e repetitivos; e preocupação persistente com partes de objetos. O atraso ou funcionamento anormal em pelo menos uma das três áreas: interação social, linguagem ou jogos imaginativos ou simbólicos, deverão se apresentar antes dos três anos de idade. E ainda, a criança não preenche os critérios para transtorno de Rett ou transtorno desintegrativo da infância.

A idade de início ou, melhor denominada, a idade de reconhecimento, na maioria dos casos ocorre durante o primeiro ou o segundo ano de vida, mas por definição é sempre antes dos três anos de idade. Seguindo as primeiras formulações de Kanner (1943) sobre a apresentação do autismo desde o nascimento, trabalhos posteriores sugeriram que o transtorno pode ser reconhecido após um período de alguns meses ou alguns anos de desenvolvimento normal (VOLKMAR; STIER; COHEN, 1985). Os fatores relacionados ao atraso na detecção do quadro são: negação parental, ambiente familiar bilíngüe e nível intelectual relativamente alto na criança. Geralmente, o atraso no desenvolvimento da fala é a causa do encaminhamento. No entanto, com frequência, os pais são assegurados de que a criança está apenas demorando um pouco para falar. Em cerca de 20 a 25% dos casos, os pais relatam que a criança parecia desenvolver alguma

linguagem, para em seguida a fala permanecer no mesmo estágio ou regredir (WERNER; DAWSON, 2005). Os pediatras teriam um importante papel no diagnóstico precoce do transtorno, pois seriam os primeiros profissionais procurados pelos pais (JOHNSON; MYERS, 2007).

Em relação ao comprometimento qualitativo da interação social, bebês e crianças autistas interessam-se pouco pela face humana. A criança pode não se envolver nos jogos de imitação da infância, com notável responsividade ao ambiente inanimado. As habilidades lúdicas podem estar completamente ausentes. O interesse social pode ser alterado ao longo do desenvolvimento, em geral havendo progressão, mas continua sendo uma área de grande deficiência mesmo para adultos com alto funcionamento e sem retardo mental.

Com mais frequência, há retardo na aquisição da linguagem. Os padrões de aquisição da linguagem (por exemplo: balbúcio) podem estar ausentes, sendo que cerca de 20% a 30% das crianças não desenvolvem a linguagem falada. As crianças podem utilizar as mãos dos pais para obter os objetos desejados e não há motivação para estabelecer comunicação verbal ou não-verbal. Os indivíduos autistas que desenvolvem a fala podem apresentar ecolalia, inversão pronominal, falta de entonação apropriada, desenvolvimento semântico prejudicado, extrema literalidade e fracasso em usar a linguagem para interação social.

As crianças com autismo podem se interessar por atividades repetitivas, como a articulação de certas palavras ou memorizar números. Os objetos escolhidos pelas crianças mais jovens, em geral, são rígidos e escolhidos por classes, como revistas para serem manuseadas. As alterações na rotina ou no ambiente podem provocar reações intensas de oposição ou respostas afetivas bizarras. Os movimentos estereotipados mais comuns incluem sacudir as mãos, andar na ponta dos pés, balançar o corpo e girar objetos.

Como características associadas, as crianças podem ser hiper ou hipo-sensíveis aos estímulos sensoriais, não reagindo quando chamadas por outras pessoas, mas sendo extremamente sensíveis a certos sons não relacionados à fala (por exemplo: o som do aspirador de pó). Pode haver sensibilidade extrema ao toque social, insensibilidade à dor, ou interesse por aspectos não-funcionais dos objetos (por exemplo: tato ou paladar).

Os indivíduos autistas apresentam retardo mental em 60 a 70% dos casos, sendo que cerca da metade deles apresenta retardo mental leve (GILLBERG, 1990; KLIN, 2006). É comum ocorrer um desempenho acentuadamente desigual nos testes de inteligência e diverso do padrão

observado em crianças retardadas sem autismo. Os indivíduos autistas apresentam déficits persistentes no pensamento abstrato e no sequenciamento e processamento de informações. As crianças autistas têm melhor rendimento em tarefas que envolvem habilidades motoras e percepto-motoras, e pior em tarefas que envolvam informação simbólica e habilidades verbais (DEMYER; HINGTGEN; JACKSON, 1981).

Ilhotas de “habilidade especiais” ou capacidades incomuns podem estar presentes. São habilidades preservadas ou altamente desenvolvidas em certas áreas que contrastam com os déficits gerais do funcionamento da criança (HERMELIN, 2001), tais como habilidades de leitura, musicais e de memorização. No entanto, as evidências apontam que menos de 10% dos indivíduos com autismo apresentam habilidades excepcionais (PRING et al., 1997).

Embora haja uma maior evidência de autismo em meninos do que em meninas, com razões relatadas de 3,5 a 4:1, se o grau de funcionamento intelectual for considerado, essa proporção passa a variar de 6 ou mais homens para cada mulher, em indivíduos com autismo sem retardo mental, e de 1,5: 1 entre os indivíduos com autismo e retardo mental moderado a grave. Possivelmente, os homens possuem um limiar mais baixo para a disfunção cerebral do que as mulheres, ou, ao contrário, um prejuízo cerebral mais grave poderia ser necessário para a ocorrência de autismo em mulheres (KLIN, 2006).

2.3 CURSO E PROGNÓSTICO

Ocorre um maior risco para convulsões durante a infância e particularmente durante a adolescência, o que caracteriza um padrão diferente da população normal, na qual o risco de convulsões diminui com a idade.

Na adolescência, um pequeno número de indivíduos autistas evolui favoravelmente, enquanto outro subgrupo apresenta deterioração comportamental. Entre os adultos portadores de transtornos do espectro do autismo os sintomas podem mimetizar ou serem mascarados por outros transtornos mentais (KAN; BUILTELAAR; VAN DER GAAG, 2008).

Cerca de 1/3 dos indivíduos com o transtorno é capaz de atingir algum nível de independência pessoal e ocupacional (HOWLIN, 2005). Os indivíduos que evoluem para a auto-suficiência pessoal e ocupacional são aqueles que atingem os níveis mais altos de habilidades cognitivas e comunicativas, embora persistam com déficits na interação social.

Os fatores preditores de evolução mais favorável são a presença de alguma linguagem de comunicação ao redor dos cinco anos, gravidade da condição e resposta à intervenção educacional.

Em relação ao prognóstico, os indivíduos com escores de quociente intelectual (QI) abaixo de 50 estão mais propensos a uma pior evolução, a desenvolver convulsões na adolescência e ao mutismo (VOLKMAR, 1995).

2.4 DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

O transtorno desintegrativo da infância difere do autismo pelo padrão de início marcante, após um período de dois anos ou mais de desenvolvimento normal, seguido por déficit nos padrões sociais e de linguagem, associado com alterações nas emoções e no relacionamento (CORBETT, 1987). Com a evolução do quadro, as crianças apresentam estereotípias e hiperatividade, podendo ocorrer deterioração cognitiva grave e importante (ASSUMPCÃO JÚNIOR; KUCZYNSKI, 2011).

O transtorno de Asperger difere do autismo por estar associado com níveis superiores de atividades cognitivas, comunicativas, habilidades de autocuidado e curiosidade sobre o ambiente (LORD et al., 2000). Preocupações incomuns, alto grau de egocentrismo e incoordenação motora ocorrem tipicamente (KLIN, 2006).

O diagnóstico de transtorno global do desenvolvimento sem outra especificação (autismo atípico) refere-se às crianças com apresentações clínicas que preenchem os critérios do domínio social e mais um critério dos outros dois domínios (comunicação e comportamento). Embora os estudos estejam sugerindo que essa categoria seja duas vezes mais comum que o transtorno autista, ela permanece subinvestigada (MERCADANTE; VAN DER GAAG; SCHWARTZMAN, 2006).

A síndrome de Rett é um transtorno neurológico degenerativo que afeta predominantemente indivíduos do sexo feminino (OLSSON; RETT 1987). Após um desenvolvimento inicial normal, tipicamente entre seis e 18 meses de idade, segue-se uma deterioração progressiva da linguagem e das habilidades comportamentais, sociais e motoras. Os sintomas clássicos incluem desaceleração do crescimento cefálico, anomalias de marcha

(ataxia/apraxia), convulsões, padrões respiratórios irregulares e escoliose, diferenciando a síndrome do autismo.

Em crianças com retardo mental grave, apresentando comportamentos estereotipados e déficit nas habilidades imaginativas, poderá ocorrer maior dificuldade para o diagnóstico diferencial com o autismo. No entanto, o contato visual e a sociabilidade preservados das crianças que apresentam apenas retardo mental contribuem para a diferenciação (STUBBE, 2008).

O autismo deve ser diferenciado dos transtornos específicos do desenvolvimento da linguagem (transtorno da articulação da fala, transtorno expressivo da linguagem e transtorno receptivo da linguagem). Embora as modalidades normais de aquisição da linguagem estejam comprometidas, as crianças com esses transtornos desejam interagir socialmente, comunicar-se e praticar jogos e brincadeiras, utilizando sinalizadores não-verbais (STUBBE, 2008).

Em relação às crianças com comprometimentos sensoriais, em especial cegueira ou surdez, congênitas ou de início precoce, a avaliação das habilidades sociais e de comunicação ajudará a definir o diagnóstico (POMEROY, 1992).

Embora algumas crianças, que foram submetidas a grave negligência, apresentem déficits na interação social, estes tipicamente evoluem para remissão com cuidados adequados (VOLKMAR, 1995).

Para a complementação do diagnóstico diferencial, os exames de neuroimagem são indicados para descartar a ocorrência de transtornos neurológicos, tais como doenças degenerativas do sistema nervoso central, e para diagnosticar anomalias cerebrais, que podem estar subjacentes aos transtornos de neurodesenvolvimento (ZILBOVICIUS; MERESSE; BODDAERT, 2006).

2.5 TRATAMENTO

As evidências apontam a importância de intervenções educacionais apropriadas, precoces e contínuas, visando à aquisição de habilidades sociais, comunicativas e cognitivas básicas (BOSA, 2006).

Embora os agentes farmacológicos não possam alterar eficazmente os sintomas nucleares do autismo, estes podem ser úteis para reduzir as características co-mórbidas e possibilitar que os

indivíduos afetados se beneficiem das intervenções comportamentais e educacionais. Os agentes farmacológicos mais utilizados são os antipsicóticos de segunda geração e os inibidores seletivos de recaptção de serotonina, por possuírem balanços mais benignos de efeitos colaterais (NIKOLOV; JONKER; SCAHILL, 2008). No entanto, são desconhecidos os benefícios, em longo prazo, da utilização desses medicamentos e somente a elucidação dos substratos fisiopatológicos do transtorno poderá embasar os avanços no desenvolvimento de novos fármacos.

2.6 FATORES GENÉTICOS

Atualmente, a importância de fatores genéticos no desenvolvimento do autismo é reconhecida mundialmente, graças aos resultados obtidos a partir de estudos utilizando casos familiares e amostras de gêmeos. Os estudos epidemiológicos com gêmeos do mesmo sexo realizados até o momento encontraram taxas de concordância significativamente maiores entre os pares monozigóticos (82 a 92%) quando comparados aos dizigóticos (1 a 10%) (FOLSTEIN; ROSEN-SHEIDLEY, 2001; MAESTRINI et al., 2000; SZATMARI et al., 1998; VEENSTRA-VANDER WEELE; COOK, 2004). Entre os gêmeos dizigóticos a taxa de concordância verificada era similar à proporção de autistas encontrada entre os irmãos de crianças afetadas, da ordem de 2 a 6%. Com base nessas taxas e assumindo um padrão de herança multifatorial, foi estimada uma herdabilidade de 90% para a susceptibilidade ao autismo. Essa observação, juntamente com o aumento da ordem de 50 a 100 vezes do risco de recorrência entre irmãos, quando comparado ao risco da população, sugere que o autismo esteja entre as doenças psiquiátricas de maior componente genético (BRUNE et al., 2006; LAMB et al., 2000; MAESTRINI et al., 2000; SZATMARI et al., 2007; TURNER; BARNBY; BAILEY et al., 2000).

A diferença marcante entre as taxas de concordância em gêmeos monozigóticos e dizigóticos e a queda abrupta da proporção de casos de autismo, conforme se afrouxam as relações de parentesco, sugerem a interação de múltiplos genes agindo de forma epistática (CARVALHEIRA; VERGANI; BRUNONI, 2004; PICKLES et al., 1995; SZATMARI et al., 2007). Ainda, uma série de traços mais sutis (como anormalidades no desenvolvimento da linguagem falada) ou de sintomas em número insuficiente para caracterizar o diagnóstico, mas que guardam muita semelhança com o fenótipo autista, está presente em uma porcentagem

considerável dos familiares dessas crianças. Quando estes traços são incluídos nos estudos com amostras de gêmeos, as taxas de concordância são ainda maiores. Dessa forma, estas características têm sido consideradas manifestações de uma predisposição genética ao autismo e a importância de se considerar o chamado “fenótipo do espectro do autismo” nos estudos de ligação e associação tem sido salientada em várias publicações (BAILEY et al., 1998; LÊ COUTEUR et al., 1996; PIVEN, 2001). Recentemente, Neves e colaboradores (2011) concluíram que prejuízos no reconhecimento de emoções faciais podem ser mais comuns em parentes de primeiro grau de pacientes autistas do que na população geral, sugerindo que tal reconhecimento seja um candidato a endofenótipo do autismo. Estes estudos e a identificação de alterações cromossômicas têm fornecido pistas sobre as bases genéticas do autismo.

Várias regiões e/ou genes de susceptibilidade para o autismo têm sido identificados através da detecção de alterações cromossômicas em indivíduos afetados e de estudos de ligação e associação. As análises citogenéticas demonstraram alterações em quase todos os cromossomos, tais como 1q, 2q, 5q, 6q, 7q, 13q, 15q, 17q, 22q, Xp e Xq, incluindo aneuploidias de autossomos, anomalias nos cromossomos sexuais, deleções, duplicações, translocações, cromossomos em anel, inversões e cromossomos marcadores (FOLSTEIN; ROSEN-SHEIDLEY, 2001; GILBERG, 1998; PERSICO; BOURGERON, 2006)). As estimativas de frequência de alterações cromossômicas em amostras de pacientes com autismo têm variado entre 5% e 48%, dependendo principalmente da exclusão ou inclusão de indivíduos com quociente intelectual (QI) muito baixo e/ou anomalias físicas nas amostras estudadas (FOLSTEIN; ROSEN-SHEIDLEY, 2001).

Quando se considera apenas o resultado de estudos citogenéticos, a região 15q11- q13 tem sido a de maior concordância na associação com o autismo (SUTCLIFFE; NURMI; LOMBROSO, 2003). É importante notar que esses pacientes costumam apresentar retardo mental e/ou epilepsia. Na maioria das vezes, a anomalia está presente sob a forma de um cromossomo 15 supranumerário isodicêntrico (inv-dup[15]) ou de duplicações intersticiais da região 15q11- q13 recíprocas às deleções associadas às síndromes de Angelman e Prader Willi (BASS et al., 2000; COOK et al., 1997; FOLSTEIN; ROSEN-SHEIDLEY, 2001; GILBERG, 1998).

2.7 RESPOSTA IMUNE E CITOCINAS

As células e moléculas responsáveis pela imunidade constituem o chamado sistema imune e a resposta deste sistema frente a uma agressão é denominada resposta imune. Esta foi didaticamente dividida em resposta inata e adaptativa. A resposta inata se dá através de mediadores tais como toxinas bacterianas, neuropeptídeos, peptídeos fibrinolíticos, cininas, fragmentos do sistema complemento, aminas vasoativas, enzimas lisossomiais e citocinas. Em relação à resposta adaptativa, esta pode ser mediada por células, através das ações de linfócitos T (LT) e citocinas (resposta imune celular), ou mediada por anticorpos, produtos de linfócitos B (LB) ativados (resposta imune humoral) (AKIRA; UEMATSU; TAKEUCHI, 2006).

Citocinas são geralmente proteínas ou glicoproteínas de peso molecular relativamente baixo (8 a 30kDa) e, frequentemente, consistem de uma única cadeia polipeptídica. Elas regulam processos biológicos importantes, tais como: crescimento e ativação celulares, inflamação, imunidade, reparo tecidual, fibrose e morfogênese (HOPKINS, 2003).

O termo citocinas já esteve baseado nos tipos celulares que as produziam; portanto, monocinas, linfocinas e interleucinas eram utilizadas para identificarem produtos de macrófagos, linfócitos e leucócitos, respectivamente. Algumas citocinas são fatores quimiotáticos para certos tipos celulares e são denominadas quimiocinas; já outras receberam a nomenclatura de acordo com suas funções biológicas. Com o advento das técnicas moleculares, tornou-se claro que a mesma proteína pode ser sintetizada por uma variedade de tipos celulares, incluindo células endoteliais e algumas células epiteliais. Por isso o termo genérico citocinas tem sido preferido para designar essa classe de mediadores (HOPKINS, 2003).

Algumas citocinas promovem inflamação e são chamadas de pró-inflamatórias, ao passo que outras, por suprimirem tal atividade, são chamadas de antiinflamatórias. Interleucina-4 (IL-4), interleucina-10 (IL-10) e interleucina-13 (IL-13) são potentes ativadoras de linfócito B; entretanto, elas também são importantes agentes antiinflamatórios por possuírem a habilidade de suprimirem genes das citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1, TNF e quimiocinas (DINARELLO, 2000).

A secreção de citocinas é um evento breve e autolimitado, não existindo como moléculas pré-formadas, e sim necessitando de ativação transcricional. Uma vez sintetizadas, elas são rapidamente secretadas (ARAI et al., 1992).

As ações das citocinas se realizam através de ligações de alta afinidade a receptores específicos, localizados nas membranas das células-alvo (VAN; DOFFERHOFF; VAN DER MEER, 1992). Diferentes citocinas utilizam vias de sinalização especializadas, tal como a via *Janus Kinases* (JAKs)/ *Sinal Transducers and Activators of Transcription* (STATs). A porção citoplasmática de muitos receptores de citocinas está associada aos membros dos receptores de tirosina-quinase da família das JAKs. Após a ligação, os JAKs tornam-se ativados por fosforilação. Uma vez ativados, eles fosforilam resíduos específicos de tirosina nos receptores de citocinas. Esses resíduos servem como porta para a entrada dos fatores de transcrição conhecidos como STATs. Proteínas STATs específicas e inativas, até então, são recrutadas aos receptores das citocinas e fosforiladas. Ao mesmo tempo em que são liberadas do receptor, as STATs dimerizam-se e são translocadas para o núcleo. Nesse local, dímeros de STATs se ligam a sequências específicas próximas aos promotores dos genes induzidos por citocinas, resultando na indução de sua produção (LEONARD; O'SHEA, 1998).

Citocinas possuem efeitos locais e sistêmicos, apresentando padrões de ação autócrino, afetando o comportamento das células que liberam as citocinas, ou parácrino, afetando o comportamento das células adjacentes, ou endócrino, afetando o comportamento de células distantes (JANEWAY JUNIOR et al., 2007).

2.7.1 Aspectos imunológicos envolvidos no Autismo infantil

Fatores imunológicos como deficiência imunológica ou autoimunidade têm sido implicados na gênese do autismo (COHLY; PANJA, 2005). A avaliação imunológica de crianças autistas tem identificado: prejuízo da imunidade celular de macrófagos (WEIZMAN et al., 1982), presença de auto-anticorpos (SINGH et al., 1988,1993), proteínas de ativação de células-T elevadas, tais como interleucina-2 solúvel e CD8 solúvel (PLIOPLYS et al., 1994; WARREN et al., 1995) e redução do número de linfócitos (ASHWOOD; WILLS; VAN DER WATER, 2006).

Como a ativação imunológica precede a autoimunidade, os níveis de marcadores de ativação imunológica foram medidos no plasma de crianças autistas e crianças saudáveis da mesma idade. Os níveis de interleucina-12 (IL-12) e interferon-gama (IFN- γ) foram significativamente mais elevados nas crianças autistas, quando comparadas aos controles (SINGH, 1996). Posteriormente, Li e colaboradores (2009) encontraram níveis aumentados de TNF- α ,

interleucina-6 (IL-6), IFN- γ e interleucina-8 (IL-8) no tecido cerebral de pacientes com TGD comparados aos controles.

Parece haver uma relação entre anomalias da resposta imunológica inata, resultando em comprometimento da resposta imunológica adaptativa, como foi indicado pelo estudo de Jyonouchi, Sun e Le (2001). Ao avaliar crianças com transtornos do espectro do autismo, irmãos saudáveis e controles, em seguida à estimulação da imunidade inata, os resultados evidenciaram excessiva resposta imune inata nas crianças com os transtornos, com maior evidência na produção de TNF- α .

Adicionalmente, o aumento significativo na produção de IFN- γ e do receptor antagonista de interleucina-1 (IL-1), além de uma tendência na direção de um aumento significativo da produção de IL-6 e TNF- α , no sangue total de crianças autistas, reforça o papel do aumento da produção das citocinas pró-inflamatórias na fisiopatologia do autismo (CROONENBERGHS et al., 2002).

Com o objetivo de encontrar evidências de neuroinflamação, foram avaliados os níveis de indicadores de ativação imunológica no líquido e no soro de crianças autistas e controles com outras doenças neurológicas. No líquido das crianças autistas foi observada redução dos níveis de ácido quinolínico, sugerindo imaturidade das vias metabólicas; redução dos níveis de neopterin, sugerindo ausência de infecção; e elevação de biopterina em comparação com os controles. No soro de 35 pessoas com autismo, entre as citocinas, somente TNF- β estava elevado em comparação com os controles (ZIMMERMAN et al., 2005).

Molloy e colaboradores (2006) compararam a produção de citocinas nas células mononucleares do sangue periférico de 20 crianças com transtornos do espectro do autismo e crianças do grupo controle, concluindo que os pacientes apresentaram uma ativação da resposta imune adaptativa, com elevação predominante de interleucina-4 (IL-4), interleucina-5 (IL-5) e interleucina-13 (IL-13), sem o aumento compensatório de interleucina-10 (IL-10). Não houve diferença significativa nos níveis de citocinas entre os pacientes que faziam uso ou não de psicofármacos.

Jyonouchi e colaboradores (2008) avaliaram um subgrupo de crianças com transtorno do espectro do Autismo, diferenciadas por apresentarem infecções frequentes acompanhadas por agravamento dos sintomas comportamentais e redução ou perda das habilidades adquiridas. Os autores não observaram associação entre os aspectos clínicos e a ocorrência de asma, alergia

alimentar e síndrome da imunodeficiência primária. Entretanto, houve alteração da resposta imune inata nesse subgrupo, medida pela produção reduzida de interleucina-1 β (IL- β) e interleucina-19 (IL-19) e aumentada de interleucina-23 (IL-23) nas células mononucleares do sangue periférico, em resposta aos agonistas de *Toll-like receptors* (TLRs).

Entre as alterações imunológicas observadas em indivíduos autistas, foi relatada a redução da atividade das células *natural killer* ou células NK (WARREN et al., 1987). Para investigar o mecanismo subjacente a essa deficiência foram examinadas amostras de sangue de 1027 crianças autistas e comparadas a 113 controles saudáveis. Os autores evidenciaram que 45% das crianças autistas apresentavam redução da ativação das células NK, sendo que a indução da atividade dessas células por interleucina-2 (IL-2), interleucina-15 (IL-15) e glutatona foi mais pronunciada no subgrupo com atividade mais baixa. Níveis reduzidos desses fatores poderiam estar implicados na redução da atividade das células NK em crianças autistas (VODJANI et al., 2008).

Permanece a dificuldade para a interpretação dos achados sobre a patogênese do autismo, devido à falha dos estudos em correlacionar as anormalidades imunológicas com os aspectos clínicos dos pacientes, à escassez de estudos longitudinais e aos achados pertinentes observados apenas em subgrupos de crianças autistas (ZIMMERMAN et al., 2005).

2.8 METABOLISMO DE FOSFOLÍPIDES E TRANSTORNOS NEUROPSIQUIÁTRICOS

Os fosfolípides são os principais componentes da membrana celular. É na bicamada lipídica da membrana que se inserem proteínas como receptores e canais iônicos, envolvidos na neurotransmissão, na transdução de sinais e na propagação dos potenciais de ação e condução do impulso nervoso (STRYER, 1988).

A bicamada de fosfolípides que compõe a membrana neuronal determina as propriedades físico-químicas das membranas. Os fosfolípides (fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina e fosfatidilserina, entre outros), além de serem os principais componentes da membrana neuronal, servem também como substratos para a síntese de mediadores intra e extracelulares, o que aumenta sua relevância para a neurotransmissão (SIEGEL, 1999). O crescimento de axônios e neuritos, a formação de novas conexões sinápticas e a eliminação das antigas conexões envolvem a síntese e a quebra de fosfolípides.

Além dessas funções, os neurotransmissores e o cálcio são contidos em vesículas fosfolipídicas. A liberação e recaptura dessas substâncias dependem da natureza das moléculas de fosfolípidos (HORROBIN; GLEN; HUDSON, 1995).

Muitos dos sistemas de sinalização intracelular são regulados por produtos lipídicos, derivados de fosfolípidos de membranas neuronais. Por exemplo, o diacilglicerol é liberado pela clivagem do fosfatidilinositol pela fosfolipase C e os ácidos graxos são liberados pela ação da fosfolipase A₂. Além disso, as prostaglandinas, os leucotrienos e outros eicosanóides, derivados de ácidos graxos, são componentes importantes do sistema de sinalização pós-receptor (DIVECHA; IRVINE, 1995). A hidrólise de fosfolípidos que ocorre durante a transdução de sinais é necessária para a eficiente regulação das funções celulares. Em contrapartida, a clivagem anormal das membranas celulares, particularmente das membranas plasmáticas, rompe a homeostase celular e compromete a viabilidade celular. Exceto em casos de danos traumáticos e de danos induzidos por peroxidação lipídica, a quebra de fosfolípidos de membrana é usualmente iniciada por meio de hidrólises enzimáticas. A quebra maciça de fosfolípidos irá não só causar a formação de segundos mensageiros, mas também mudanças da permeabilidade celular das membranas (O'REGAN; ALIX; WOODBURY, 1996).

Os fosfolípidos mais encontrados nos tecidos cerebrais são ricos em ácidos graxos poliinsaturados de três a seis ligações covalentes duplas. Esses fosfolípidos são importantes para permitir rápidas mudanças no formato da membrana e assim permitir a fusão de membranas, como ocorre durante a formação e degradação de conexões sinápticas e na liberação de neurotransmissores. É essa rica estrutura de ácidos graxos poliinsaturados que confere às membranas neuronais suas propriedades específicas em relação à sinalização celular e à modulação funcional de proteínas ligadas ou associadas à membrana (WALKER et al., 1999).

Os ácidos graxos poliinsaturados são derivados desnaturados e alongados dos ácidos graxos essenciais, como o ácido linoléico e o ácido α -linoléico. Os ácidos graxos essenciais não podem ser sintetizados por humanos e devem ser provenientes da dieta. Há 12 ácidos graxos essenciais distribuídos em duas séries: ômega-3 e ômega-6.

Embora as enzimas e as proteínas que regulam o metabolismo de fosfolípidos sejam geneticamente determinadas, elas dependem dos ácidos graxos essenciais providos pela alimentação. Portanto, a estrutura final de cada molécula de fosfolípido depende da interação entre fatores genéticos e ambientais. Uma vez que, os fosfolípidos são componentes estruturais de

todas as membranas neuronais, e que desenvolvem papel chave no processo de transdução de sinais, anormalidades no metabolismo de fosfolípidos podem contribuir para a fisiopatologia dos transtornos psiquiátricos (HORROBIN; BENNETT, 1999).

Membranas neuronais são degradadas por hidrólise e via receptores com o envolvimento de fosfolipases, lisofosfolipases e lipases (FAROOQUI; HORROCKS; FAROOQUI, 2000a, 2000b). O metabolismo de ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) presentes na membrana do SNC é predominantemente controlado pela fosfolipase A₂ (PLA₂) e aciltransferases em um ciclo conhecido como deacilação-reacilação (FAROOQUI; HORROCKS; FAROOQUI, 2000a; LANDS; CRAWFORD, 1979; SUN; MacQUARRIE, 1989).

2.8.1 Esquizofrenia

O aumento da atividade da PLA₂ foi relatado no soro, plasma, plaquetas e tecido cerebral de pacientes com esquizofrenia (GATTAZ; HÜBNER; NEVALAINEN, 1990; GATTAZ; KÖLLISCH; THUREN, 1987; GATTAZ; STEUDLE; MARAS, 1995; GLEN et al., 1994; HORROBIN, 1998; SMESNY et al., 2005; TAVARES et al., 2003), sugerindo um acelerado metabolismo de fosfolípidos da membrana nesta patologia.

As alterações no metabolismo de fosfolípidos foram encontradas também em tecido cerebral humano em um estudo *post mortem* no lobo frontal de pacientes com esquizofrenia (HORROBIN et al., 1991). Além disso, estudos de Espectroscopia de Ressonância Magnética do Fósforo (³¹P-MRS) no lobo frontal de pacientes com esquizofrenia encontram uma diminuição de fosfomoésteres e aumento de fosfodiésteres, respectivamente, precursores e metabólitos dos fosfolípidos no cérebro (HINSBERG et al.; PETEGREW; KESSHAVAN; MINSSHEW, 1993). As alterações encontradas no lobo frontal de pacientes com esquizofrenia sustentam a teoria da hipofrontalidade causada pela inibição da atividade dopaminérgica.

Esses achados no cérebro, embora ainda controversos (YAKUBIAN et al., 2002), confirmam resultados de estudos anteriores, que encontraram uma diminuição da concentração de fosfolípidos nos eritrócitos de pacientes com esquizofrenia (ROTROSEN; WOLKIN, 1987) e um aumento da concentração do metabólito lisofosfatidilcolina na membrana de plaquetas (PANGERL et al., 1991). Além disso, a concentração de ácido araquidônico (ARA) em

eritrócitos estava reduzida em um subgrupo de pacientes esquizofrênicos (GLEN et al., 1994; PEET et al., 1994).

A aceleração do metabolismo de fosfolípidos, citada anteriormente, tem sido atribuída principalmente ao aumento da atividade da cPLA₂, a qual seletivamente cliva o ARA de vesículas de membranas naturais (CLARK et al., 1991). Isso está de acordo com achados de que níveis do ARA e ácido docosahexaenóico (DHA) estão significativamente diminuídos em pacientes com esquizofrenia (PEET et al., 1998) e com relatos de uma significativa redução nos sintomas positivos depois da suplementação com ácidos graxos essenciais (PEET, 1999).

O estudo de Smesny et al. (2010) evidenciou aumento da atividade da PLA₂ em pacientes esquizofrênicos, indicando uma associação potencial entre a bioquímica da membrana lipídica e alterações focais da estrutura cerebral reveladas através de imagens de ressonância magnética, com diferentes padrões em pacientes no primeiro episódio comparados aos pacientes crônicos.

Além disso, é de interesse notar que um aumento da PLA₂ já foi observado em outras doenças neuropsiquiátricas nas quais possam ocorrer sintomas psicóticos, como na epilepsia do lobo temporal e na esclerose múltipla (VISIOLI et al., 1994; GATAZZ et al., 2011).

2.8.2 Transtornos do humor

A depressão maior é um transtorno do humor que atinge milhões de pessoas em todo o mundo (HASIN et al., 2005). Um grande número de medicações está disponível para manter sob controle os sintomas da doença, e sabe-se que de uma forma geral os antidepressivos aumentam os níveis de monoaminas sinápticas como norepinefrina, serotonina e dopamina em determinadas regiões cerebrais (FRAZER, 2000). As monominas ativam seus receptores cognatos pós-sinápticos e modulam a atividade de cascatas de sinalização de *downstream* para produzir o efeito antidepressivo (COYLE; DUMAN, 2003; TAYLOR et al., 2005). Receptores de monoaminas estão envolvidos em diversas cascatas de sinalização, incluindo aquelas mediadas por adenilciclase, fosfolipase e proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) (DUMUIS; SEBEN; BOCKAERT, 1988; UNDE et al., 1994).

Além dos fármacos, uma estratégia utilizada no tratamento de depressão é a eletroconvulsoterapia (ECT), um procedimento que induz a convulsões generalizadas pela passagem de uma corrente elétrica pelo cérebro. Muitas teorias são propostas para explicar os

benefícios terapêuticos da ECT (SACKEIM, 1994). Uma das hipóteses postuladas é que a ECT interfira no metabolismo dos fosfolípides de membrana, via modulação da PLA₂ (BAZAN; TU; RODRIGUEZ DE TURKO, 2002).

A relação entre a anormalidade do metabolismo de fosfolípides e o transtorno afetivo bipolar foi postulada por Hibbeln, Palmer e Davis (1989). Estudos relacionam essa anormalidade ao crescimento e sinalização neuronal (SUN et al., 2004) sugeridos, então, como possível fator etiológico nesta doença.

Horrobin e Bennet (1999) propuseram que a superativação da PLA₂ como uma possível explicação para a natureza cíclica da patogênese do transtorno bipolar e que o lítio, um estabilizador do humor, possa prevenir tanto o aumento excessivo quanto a depleção de ácidos graxos pela inibição da PLA₂.

2.8.3 Epilepsia

Os mecanismos da epileptogênese iniciam-se com a excitação da membrana neuronal. Alterações no metabolismo dos fosfolípides que compõem a membrana podem alterar o estado de excitação celular. Alguns estudos descrevem que as crises epiléticas promovem uma superativação da PLA₂, que resulta no acúmulo de lípides bioativos nas sinapses. Uma estimulação prolongada da PLA₂ pode danificar a integridade da membrana não somente pelo aumento excessivo de cálcio intracelular que levaria à lipólise, proteólise excessiva e à fragmentação de DNA, mas também pela perda de fosfolípides essenciais para a formação da dupla camada lipídica, devido à característica detergente de fator ativador de plaqueta (PAF), produto da hidrólise do ARA (FAROOQUI et al., 1996; BAZAN et al., 2002).

Gattaz e colaboradores (2011) evidenciaram que a atividade de PLA₂ no hipocampo de pacientes com epilepsia do lobo temporal e psicose estava significativamente aumentada, quando comparada com a atividade em pacientes com epilepsia sem psicose. Os autores sugerem que o aumento da atividade de PLA₂ no cérebro não seria específico para esquizofrenia, mas estaria associado à manifestação de sintomas psicóticos em geral.

2.8.4 Doença de *Alzheimer* (DA)

A diminuição da atividade da PLA₂ resulta em redução do metabolismo dos fosfomonoésteres, seus substratos naturais. A diminuição da transformação da fosfatidilcolina em ARA e lisofosfatidilcolina em neurônios colinérgicos comprometem a formação da colina, substrato de síntese da acetilcolina e, conseqüentemente, contribui para um déficit colinérgico (SCHAEFFER, 2004). Esse déficit primariamente resultante de uma degeneração de neurônios colinérgicos é discutido como aspecto central do distúrbio cognitivo na doença de *Alzheimer*. Além disso, supõe-se que um distúrbio do metabolismo da proteína precursora do amilóide (APP) com a conseqüente deposição do peptídeo A β nos tecidos cerebrais, seja um processo fundamental para a patogênese da DA (MENDES, 2004). Uma série de mecanismos enzimáticos pode resultar nesta desregulação do metabolismo da APP. Assim, a investigação de proteínas relacionadas com o metabolismo de APP tem contribuído para a elucidação de rotas alternativas na patogênese da DA. A ativação da PLA₂ parece ser responsável por um aumento na liberação da APP solúvel no meio extracelular, enquanto a redução da atividade da PLA₂ diminui a secreção da APP solúvel. Isso pode explicar a correlação existente entre a redução da atividade da PLA₂ e a formação de placas neuríticas no cérebro de paciente com a DA. Nesse contexto, uma redução da atividade de PLA₂ pode contribuir para a amiloidogênese, com conseqüente degeneração neuronal e déficit colinérgico (FORLENZA; SCHAEFFER; GATTAZ, 2007; GATTAZ; MARAS; CAIRNS 1995; SCHAEFFER; GATTAZ, 2008).

De fato, níveis reduzidos de PLA₂ já foram encontrados em amostras de tecido cerebral e plaquetas de pacientes com DA, afetando de forma negativa o metabolismo fosfolipídico da membrana celular e, conseqüentemente, alterando o funcionamento do cérebro (GATTAZ et al., 1996). Farooqui, Ong e Horrocks (2006) relataram que modificações nos fosfolípidos de membrana ocorreram antes mesmo das primeiras manifestações clínicas da DA, e que metabólitos do ARA são encontrados próximos aos neurofilamentos.

Estudos mais recentes procuram relacionar as isoformas de PLA₂ cerebral com as alterações encontradas na DA, tais como a inibição das isoformas cPLA₂ e iPLA₂ contribuindo para o prejuízo da neurogênese (SCHAEFFER et al., 2010).

2.8.5 Transtornos mentais da infância

Níveis reduzidos de ácidos graxos poliinsaturados foram encontrados no plasma de meninos com Transtorno de hiperatividade com déficit de atenção, em relação aos controles, com evidências de correlação entre essa redução e uma série de problemas comportamentais e de aprendizado (STEVENS et al., 1995, 1996).

Um estudo realizado com 97 crianças disléxicas verificou a associação de altas taxas de deficiência de ácidos graxos poliinsaturados, evidenciadas por sinais clínicos, com déficits mais severos na leitura. Essa relação foi exclusiva para meninos, para os quais os sinais de deficiência de ácidos graxos foram também fortemente ligados com déficits mais severos na memória auditiva (RICHARDSON et al., 2000).

Embora evidências teóricas e experimentais apontem o papel dos ácidos graxos ômega-3 no transtorno de hiperatividade com déficit de atenção, dislexia, transtorno do desenvolvimento da coordenação e autismo, os poucos estudos nessa área têm envolvido diferentes populações e formulações terapêuticas (RICHARDSON, 2006).

Os transtornos do espectro do autismo também parecem envolver uma aberração no metabolismo lipídico, a qual resultaria em alterações da estrutura e função da membrana celular fosfolipídica, sendo essas alterações semelhantes às encontradas em outros transtornos do desenvolvimento (BELL et al., 2000). A redução expressiva dos níveis de ácidos graxos poliinsaturados da membrana de eritrócitos de um paciente autista, quando comparado aos controles, reforça essa suposição (BELL et al., 2000). Um outro estudo realizado posteriormente com crianças portadoras de transtornos desse espectro demonstrou que as mesmas apresentavam atividade significativamente elevada de PLA₂, quando comparadas aos controles (BELL et al., 2004). As evidências sugerem que a instabilidade observada nos ácidos graxos pode ser causada pelo aumento da atividade da PLA₂, talvez em associação com o aumento do estresse oxidativo.

Quando crianças autistas foram comparadas com controles com desenvolvimento típico, pareados por idade, foi evidenciado uma elevação da taxa de ácido araquidônico:ácido eicosapentaenóico (ARA:EPA) nos eritrócitos e plasma das primeiras, sugerindo que um desequilíbrio dos ácidos graxos essenciais altamente insaturados possa ocorrer em um grupo de crianças autistas (BELL et al., 2010).

Embora a oferta de ômega-3 para crianças com Transtornos do espectro do autismo pareça ser segura e possa ser útil, com melhora comportamental em escala de avaliação (MEIRI; BICHOVSKY; BELMAKER, 2009), nenhuma melhora significativa foi observada em relação à gravidade ou frequência dos sintomas comportamentais durante ou após tratamento com suplemento de ômega-3 em adultos com autismo severo (POLITI et al., 2008).

Pastural e colaboradores (2009) observaram que biomarcadores de ácidos graxos alongados e desnaturados estavam significativamente elevados em todas as crianças autistas estudadas. Adicionalmente, a exposição de neurônios, astrócitos e hepatócitos *in vitro* a níveis elevados de glutamato extracelular resultou em alterações dos biomarcadores lipídicos similares às aquelas encontradas em indivíduos autistas, além de redução dos níveis de glutamato, metionina e cisteína.

Em uma série de estudos de revisão Blaylock e Strunecka (2009) e Blaylock (2009a, 2009b) propuseram a relação entre os sintomas transtornos do espectro do autismo e a desregulação da neurotransmissão glutamatérgica no cérebro com exacerbação da função de receptores excitatórios por imunocitocinas inflamatórias. Excitocinas ambientais e aditivos alimentares poderiam elevar os níveis de glutamato no sangue e no cérebro, resultando em conectividade anormal no cérebro em desenvolvimento, e fatores como estimulação imune periférica, mercúrio e elevados níveis de andrógenos poderiam estimular a ativação microglial.

Recentemente, El-Ansary, Beb Bacha e Al-Ayadhi (2011a) avaliaram o perfil de ácidos graxos no plasma de 26 crianças autistas, pareadas por idade com 26 crianças saudáveis. Os resultados indicaram uma elevação nos níveis da maioria dos ácidos graxos saturados, exceto do ácido propiônico, e uma redução nos níveis da maioria dos ácidos graxos poliinsaturados. Em seguida, os mesmos autores compararam as concentrações relativas de ácidos graxos essenciais, linoléico (LA) e α -linoléico (ALA), ácidos graxos poliinsaturados alongados e fosfolípidos do plasma de 25 crianças autistas com o plasma de 16 crianças saudáveis, pareadas por idade. Os autores encontraram taxas elevadas de LA/ARA, ALA/DHA e EPA/ARA e taxas reduzidas de ARA/DHA no grupo de pacientes e sugeriram que os níveis reduzidos de ARA e DHA nessas crianças podem se dever ao aumento da atividade de PLA₂ (EL-ANSARY; BEB BACHA; AL-AYADHI, 2011b).

2.9 ESTRESSE OXIDATIVO NO AUTISMO INFANTIL

Sob circunstâncias fisiológicas, existe um equilíbrio dinâmico entre a produção de espécies reativas de oxigênio provenientes da utilização do mesmo na respiração celular mitocondrial e a capacidade antioxidante da célula. O estresse oxidativo acontece quando a produção das espécies reativas de oxigênio supera as defesas bioquímicas das células, ocasionando danos às mesmas (CHAUAN et al., 2004).

Vários estudos têm proposto que o óxido nítrico (NO) e outros parâmetros relacionados ao estresse oxidativo podem ter um papel na patogênese do autismo. Sögüt e colaboradores (2003), ao comparar crianças autistas com controles saudáveis, detectaram que as primeiras apresentaram níveis elevados de NO nos eritrócitos. Sweeten e colaboradores (2004) confirmaram que os níveis plasmáticos dos metabólitos de óxido nítrico (nitrito e nitrato) estavam significativamente aumentados entre as crianças autistas, embora os níveis plasmáticos das citocinas não diferissem entre estes grupos. Entre as crianças autistas, houve uma correlação positiva entre os níveis plasmáticos dos metabólitos de NO e IFN- γ , sugerindo que a produção elevada de óxido nítrico possa ser secundária à indução da enzima sintetizadora de NO mediada pelo IFN- γ .

Zoroglu e colaboradores (2003) observaram níveis plasmáticos significativamente maiores de nitrito e adrenomedulina, um hormônio indutor da liberação de NO, no grupo de crianças autistas, quando comparados ao grupo controle.

Comparando a peroxidação lipídica no plasma de crianças autistas e seus irmãos saudáveis, foi observado que a peroxidação estava elevada nas crianças autistas, indicando aumento do estresse oxidativo no transtorno. Adicionalmente, os níveis de proteínas antioxidantes como transferrina e ceruloplasmina no soro estavam significativamente reduzidos (CHAUHAN et al., 2004).

E ainda, o perfil metabólico de um grupo de crianças autistas, avaliadas por James e colaboradores (2004), foi consistente com dano na capacidade de metilação e aumento do estresse oxidativo. Os autores concluem que uma maior vulnerabilidade ao estresse oxidativo e uma capacidade reduzida para metilação poderia contribuir para o desenvolvimento e manifestações clínicas do autismo.

Rossignol (2007) relacionou as evidências fisiopatológicas do autismo, tais como hipoperfusão cerebral, neuroinflamação, desregulação imunológica e estresse oxidativo aos efeitos da terapia com oxigênio hiperbárico, que reduziria todos esses fatores, levantando a hipótese sobre o benefício de tal terapia para crianças autistas, a ser investigada por novos estudos.

Outros biomarcadores de estresse oxidativo têm sido estudados no autismo infantil. James e colaboradores (2009) encontraram capacidade de reserva de glutathione reduzida em ambos citosol e mitocôndria de células linfoblastóides de crianças autistas, sugerindo comprometimento da defesa antioxidante e da capacidade de detoxificação sob condições pró-oxidantes.

Prya e Geetha (2011) evidenciaram níveis elevados de NO no sangue de crianças autistas e maior percentual de nitração no cabelo e unhas, com alterações mais significativas no grupo com autismo de baixo funcionamento, quando comparadas com grupo de autismo de alto funcionamento e controles.

3 HIPÓTESE

Crianças autistas têm alterações na resposta imunológica, no metabolismo de fosfolípides e no perfil de desenvolvimento e existe uma correlação entre essas alterações.

4 OBJETIVOS

4.1 GERAL

Avaliar fatores imunológicos, o perfil de fosfolípides de membrana e o perfil de desenvolvimento de crianças com autismo infantil e comparar com os indivíduos controles.

4.2 ESPECÍFICOS

- Realizar a avaliação psiquiátrica das crianças encaminhadas com o diagnóstico de autismo, incluindo a elaboração da história psiquiátrica e do exame do estado mental.
- Proceder à dosagem de interferon- γ (IFN- γ), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina-2 (IL-2), interleucina-4 (IL-4), interleucina-6 (IL-6), interleucina-10 (IL-10) e à determinação dos níveis plasmáticos dos fosfolípides e do óxido nítrico (NO) nos grupos de interesse.
- Aplicar o Perfil Psicoeducacional Revisado (PEP-R) nas crianças autistas e nas crianças do grupo controle.
- Comparar os aspectos imunológicos, os aspectos bioquímicos e o perfil de desenvolvimento das crianças autistas e das crianças do grupo controle e analisar a correlação desses fatores.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 CASUÍSTICA

Este projeto foi desenvolvido no Núcleo de Identificação e Quantificação Analítica (NIQUA) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) e contou com o apoio do Departamento de Imunologia da UFJF, do Serviço de Psiquiatria e Psicologia Médica do Hospital Universitário da UFJF, do Centro de Atenção Psicossocial Infanto-Juvenil de Juiz de Fora (Departamento de Saúde Mental – Secretaria Municipal de Saúde), da Fundação de Apoio ao Indivíduo com Necessidades Especiais (FIAINE), da Escola Estadual Maria das Dores e das Associações de Pais e Amigos dos Excepcionais (APAEs) de Juiz de Fora, Rio Pomba, Ubá e Muriaé.

O estudo pretendia incluir 30 crianças autistas e 30 crianças que não apresentassem características diagnósticas de qualquer transtorno mental e de comportamento, ou sintomas clínicos que pudessem indicar a ocorrência de qualquer doença, pareadas por idade e sexo.

As crianças com o diagnóstico de Autismo foram encaminhadas pelas instituições que apoiavam o trabalho, de acordo com os seguintes critérios de inclusão: crianças de 2 a 18 anos de idade, com o diagnóstico ou a hipótese diagnóstica de Autismo. Foram excluídos do estudo 22 pacientes que apresentavam outros transtornos mentais, doença neurológica ou deficiência sensorial que pudessem estar relacionados ao déficit do desenvolvimento, tais como rubéola congênita associada a retardo mental grave, paralisia cerebral, surdez e cegueira (Figura 1).

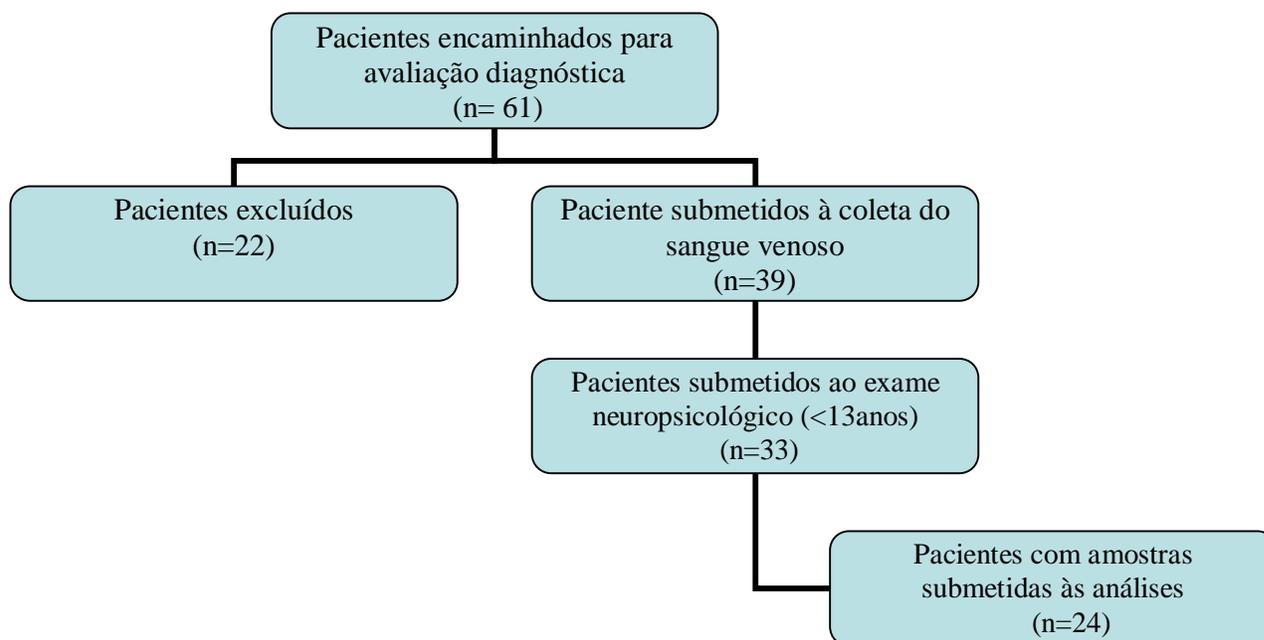


Figura 1- Diagrama com a formação do grupo de pacientes.

As crianças do grupo controle foram selecionadas por conveniência e entre estudantes de duas escolas (uma particular e outra pública). O grupo foi composto por crianças de 2 a 12 anos de idade, que não apresentavam sintomas de transtornos mentais ou demanda para atendimento nos serviços de atenção à saúde, e que não faziam uso de qualquer fármaco.

Para a formação do grupo controle, a pesquisadora realizou duas reuniões em cada uma das escolas, para convidar os pais a participarem da pesquisa. A Escola Estadual Fernando Lobo foi escolhida por ter como alunos duas crianças autistas que faziam parte da pesquisa, o que facilitou a aceitação da direção da escola e dos pais. Adicionalmente, a escola oferecia uma amostra representativa da população que seria atendida pelas instituições incluídas. Como essa e outras escolas públicas consultadas não atendiam crianças na pré-escola, tornou-se necessária a inclusão de alunos de uma instituição particular (Escola SESC Espaço Livre), escolhida por atender crianças de classe média, em sua maioria filhos de comerciantes (Figura 2). Uma das crianças se recusou a fazer a coleta de sangue e por isso não fez parte da casuística deste projeto.

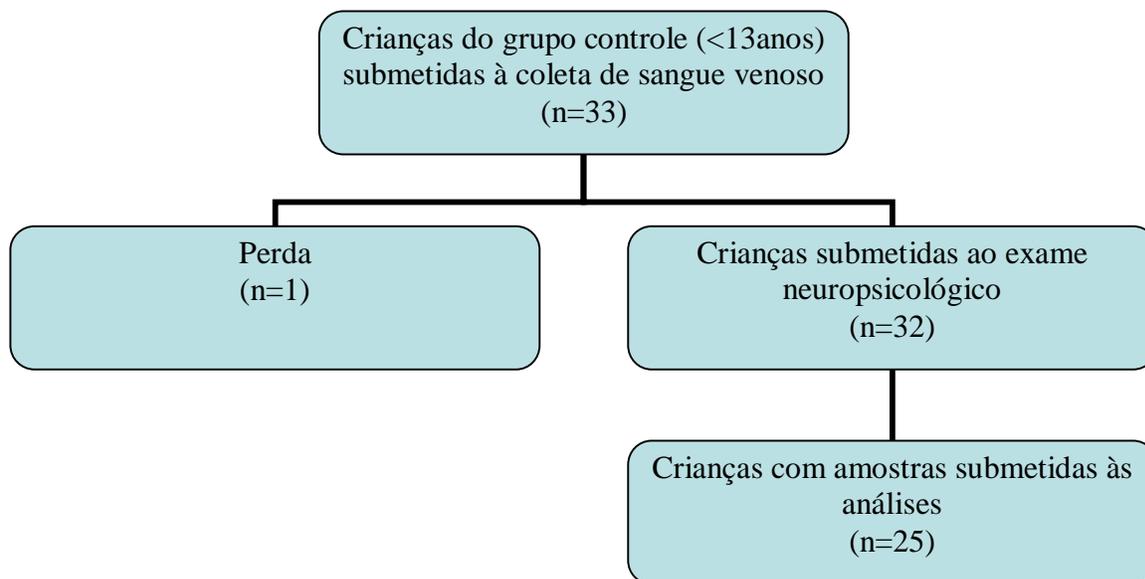


Figura 2- Diagrama com a formação do grupo controle.

Em seguida, foram marcadas reuniões em particular com os pais, os quais se dispuseram a participar, para a aplicação dos critérios de inclusão e exclusão. Os Termos de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Anexo B) foram preenchidos e assinados, após a explicação do protocolo de pesquisa, por todos os pais ou responsáveis.

Todos os pacientes foram submetidos à avaliação diagnóstica efetuada pela pesquisadora clínica, para realização do diagnóstico de Autismo de acordo com os critérios diagnósticos do DSM-IV-TR (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2000) e para a exclusão de comorbidades. Em uma primeira entrevista clínica, foi iniciado o processo de avaliação, com a continuidade da aplicação dos critérios de inclusão e exclusão. Em uma segunda entrevista clínica, foi complementada a história psiquiátrica com o exame do estado mental, seguindo o roteiro proposto por Brasil (2004). Outras entrevistas foram realizadas sempre que necessárias à conclusão dessas etapas.

Os familiares das crianças com transtornos globais do desenvolvimento (transtornos do espectro do autismo), que haviam sido submetidas a exames de neuroimagem (ressonância magnética do encéfalo ou tomografia computadorizada do crânio), apresentaram os laudos correspondentes (Anexo C). Para as demais crianças foram realizados exames de tomografia

computadorizada do crânio, através do serviço público de saúde, para a exclusão de doenças neurológicas que cursam com sintomas equivalentes aos apresentados pelas crianças com autismo infantil.

5.2 COLETA DE SANGUE

Amostra de sangue venoso (10 mL) foi coletada por punção periférica da veia do antebraço das crianças autistas e das crianças pertencentes ao grupo controle utilizando *scalp* 21G (Becton Dickinson, USA). O sangue coletado em dois tubos, sendo um com anticoagulante (heparina lítica) e outro sem anticoagulante, acondicionado em recipiente com gelo (para transporte), foi em seguida centrifugado a 3.000 rpm por 15 minutos à temperatura ambiente. Em seguida as alíquotas foram armazenadas em freezer à temperatura de -70°C , até o momento das análises laboratoriais propostas neste projeto e descritas a seguir. Todo o material foi codificado de modo que a identidade dos participantes não fosse revelada e todos os procedimentos obedeceram às boas práticas laboratoriais.

5.3 ANÁLISES LABORATORIAIS

5.3.1 Determinação de citocinas

Amostras de soro dos pacientes e dos indivíduos-controle foram submetidas à análise quantitativa de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α e IFN- γ , através da Citometria de Fluxo, utilizando o sistema BD *Cytometric Bead Array* (CBA), de acordo com as instruções do fabricante. As amostras (100 μL) de soro foram descongeladas em banho-maria a 37°C e centrifugadas por 10 minutos a 3700 rpm à temperatura ambiente. Posteriormente, 25 μL da porção média do sobrenadante foram coletados e adicionados à 3 μL de cada reagente (corresponde aos *beads* marcados com cada anticorpo usado para marcar a produção das citocinas). Em seguida, as amostras foram incubadas por 1,5 horas e lavadas com 500 μL de reagente F (tampão de lavagem) e centrifugadas a 1.300 rpm durante 7 minutos à temperatura ambiente. Em cada tubo, os sobrenadantes provenientes dessa centrifugação foram aspirados com bomba de vácuo. A seguir, foram adicionados 18 μL de revelador fluorescente (reagente B) em cada amostra, para

incubação a temperatura ambiente por 1,5 horas. Após esse período, as amostras foram novamente lavadas, centrifugadas e aspiradas nas mesmas condições já citadas. Em cada tubo foram adicionados 100 μ L de reagente F para posterior leitura no citômetro de fluxo FACScalibur (Becton Dickison, San Jose, CA, USA). Após a leitura de padrões e amostras, os dados foram analisados com auxílio do software BD CBA *Isotype Analysis* (Becton Dickison, San Jose, CA, USA), com os valores representados em concentração (pg/mL) de cada citocina. A concentração foi obtida através da correlação com a curva-padrão feita em paralelo para cada citocina. As análises foram executadas em duplicata.

5.3.2 Determinação dos ácidos graxos

Os ácidos graxos foram determinados de acordo com o método originalmente descrito por Folch, Lees e Stanley (1957) e modificado por El-Ansary, Ben Bacha e Al-Ayahdi (2011a). Resumidamente, 200 μ L de amostra foram extraídos na presença de padrões internos e ácido graxo metilado usando solução metanólica de ácido clorídrico 3N em frascos selados e sob nitrogênio. As amostras foram incubadas a 100°C por 45 minutos. Os ésteres metílicos de ácidos graxos livres foram extraídos com n-hexano e a composição de ácidos graxos do extrato foi analisada em um cromatógrafo a gás (Helwlett- Packard 5890 series II plus, HP analítica Direct, Wilmington, DE), equipado com detector de ionização de chama e empregando coluna capilar de 30m X 0,25 mm X 0,25 μ M (Omegawax, Supelco). A taxa de fluxo de gás hélio foi de 1,2 mL/minuto, com uma razão de separação/fluxo de 50:1. A temperatura do forno foi de 205°C. O injetor e o detector de temperaturas foram 260°C e 262°C, respectivamente. Dois padrões internos, C15:0 e C23:0, foram adicionados durante a análise. Os ácidos graxos EPA, ARA e DHA foram identificados através de comparação dos tempos de retenção com padrões autênticos. O resultado de cada ácido graxo foi expresso como peso percentual do total de ácidos graxos presente na amostra. As análises foram realizadas em duplicata.

5.3.3 Determinação de PLA₂

A atividade de PLA₂ foi avaliada fluorimetricamente utilizando como substrato um análogo fosfolipídico marcado, o C28-O-PHPM (1-octasnil, 2-(piren-1-il)-hexanoil-*sn*-

glicerofosfometanol). Quarenta microlitros (40 μ L) de soro foram incubados a 37°C por 90 minutos na presença do tampão (volume final de 200 μ L) contendo solução de C28-O-PHPM na concentração de 30 μ M e Tris/HCl pH 7,4 na concentração de 14 mM. Após a incubação, a reação foi interrompida e o ácido pirenilhexanóico extraído e quantificado tal como descrito por Ross e colaboradores (1997). O branco das reações continha soro, mas foram interrompidas no tempo zero.

5.3.4 Determinação de óxido nítrico

A clarificação do plasma para sedimentação de proteínas foi obtida através da adição de 25 μ L de solução de ácido tricloroacético (TCA) 50% a 100 μ L da amostra de plasma, a qual foi homogeneizada em vórtex e centrifugada em 14.000 rpm por 5 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante (50 μ L) foi transferido para outra placa para a realização da dosagem de óxido nítrico.

O óxido nítrico foi determinado de acordo com o método de *Griess* descrito por Green e colaboradores (1982). Resumidamente, 50 μ L de sulfanilamida a 1% e 50 μ L de N-1-dihidroclorato de naftiletlenodiamina a 0,1% em ácido fosfórico a 2,5% foram adicionados a cada 100 μ L das amostras de plasma dos pacientes, controles e curvas-padrão. As absorvâncias lidas em comprimento de onda fixo ($\lambda=540$ nm) foram obtidas utilizando leitora de microplaca Spectra MAX 190 (Molecular Devices, USA). Os valores de nitrito foram obtidos extrapolando os valores para cada curva-padrão realizada com nitrito de sódio (200-1,56 μ Mol).

5.4 AVALIAÇÃO NEUROPSICOLÓGICA

A avaliação neuropsicológica foi aplicada individualmente às crianças com idade inferior a 13 anos, que receberam o diagnóstico de Autismo infantil, após a avaliação psiquiátrica, e às crianças do grupo controle. A avaliação foi realizada através da aplicação do PEP-R, instrumento criado para avaliar a idade de desenvolvimento em crianças com autismo (SCHOPLER et al., 1990). As propriedades psicométricas da versão brasileira foram avaliadas por Leon e colaboradores (2004). O PEP é composto por uma escala de desenvolvimento e uma escala de comportamento, caracterizando-se como um inventário de habilidades e comportamentos criado

para identificar padrões de aprendizagem irregulares e idiossincráticos (Anexo D). A escala de desenvolvimento incluiu as seguintes dimensões: coordenação motora ampla, coordenação motora fina, coordenação visuo-motora, percepção, imitação, *performance* cognitiva e cognição verbal. A aplicação foi realizada por uma neuropsicóloga, pela pesquisadora clínica e dois estagiários de psicologia, realizada em um único encontro, com duração de cerca de uma hora. A escala de comportamento, caracterizada pela identificação de comportamentos atípicos, embora tenha sido efetuada, não foi utilizada para as correlações dessa pesquisa, por considerarmos que os mesmos variaram amplamente, inclusive em decorrência ao uso de psicofármacos, e não se relacionavam ao nível de desenvolvimento da criança. Após a correção do teste, a pontuação total obtida por cada paciente ou controle indicou uma determinada idade de desenvolvimento (ID) de acordo com a Tabela no Anexo E. O quociente de desenvolvimento (QD) foi calculado para o grupo de pacientes utilizando-se a fórmula $QD = ID/IC \times 100$, onde IC é a idade cronológica em meses.

5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram submetidos à análise estatística descritiva (medidas de dispersão: média, desvio padrão ou erro padrão e frequência). Para a análise de correlação entre os parâmetros utilizou-se o coeficiente de correlação de *Pearson*. Para comparar se havia diferenças nas dosagens imunológicas e no déficit cognitivo entre os grupos estudados foi executada análise de variância (ANOVA), com Bonferroni como teste *post hoc*. O nível de significância utilizado foi de 5%. A análise estatística foi realizada com o auxílio do Programa *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS) versão 13.0 para Windows.

5.6 ASPECTOS ÉTICOS

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da UFJF e aprovado em 02/08/2007, sob o parecer número 140/2007 (Anexo A).

6 RESULTADOS

6.1 CASUÍSTICA

Os dados demográficos do grupo de pacientes (n=24) e do grupo controle (n=24) são mostrados na Tabela 1. A média de idade no grupo de pacientes foi de $7,4 \pm 2,7$ anos e no grupo controle foi de $7,2 \pm 1,8$ anos. A variação de idade em ambos os grupos foi de 2 a 12 anos. Um total de 18 crianças eram meninos em cada um dos grupos, mantendo uma proporção de meninos/meninas igual a 3/1.

Tabela 1 – Dados demográficos dos participantes do estudo.

Grupos	Sexo	Idade * (anos)	Uso de Medicação	Crise convulsiva
Controle (n=24)	18M/6F	7,41±2,96	0	0
Paciente (n=24)	18M/6F	7,41±2,96	87,5% (21/24)	37,5% (9/24)

* Resultados expressos como média \pm desvio-padrão; M= sexo masculino e F= sexo feminino.

No período de uma semana que precedeu a coleta de sangue, as crianças de ambos os grupos não iniciaram o uso de quaisquer medicações. Entre as 24 crianças do grupo de pacientes, 21 estavam fazendo uso de psicofármacos no período das avaliações, com o objetivo de tratar os sintomas associados ao autismo, em regime de monoterapia (n= 7) ou politerapia (n=14), sendo que os fármacos mais frequentemente prescritos foram risperidona e carbamazepina, associados entre si ou com outros fármacos. As crianças do grupo controle não estavam em uso de qualquer medicação. As crianças de ambos os grupos não faziam uso de suplementos contendo ômega-3 e/ou ômega-6.

No grupo de pacientes havia 9 crianças (37,5%) com história de apresentação de crises convulsivas durante o seu desenvolvimento. No grupo controle, nenhuma criança apresentou o mesmo histórico.

6.2 PARÂMETROS PSICOMÉTRICOS

A partir da aplicação da escala de desenvolvimento do PEP-R os escores brutos finais foram obtidos com base na soma dos pontos da categoria “Passou”, com um ponto creditado para cada item dessa categoria. O grupo de crianças com o diagnóstico de autismo (n=24) apresentou pontuação média de $31,12 \pm 23,75$ e o grupo controle (n=24) de $120,79$ pontos $\pm 19,21$. Como pode ser observado no Gráfico 1, a média dos escores no grupo controle foi 3,8 vezes maior que a média no grupo de pacientes, sendo essa diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$).

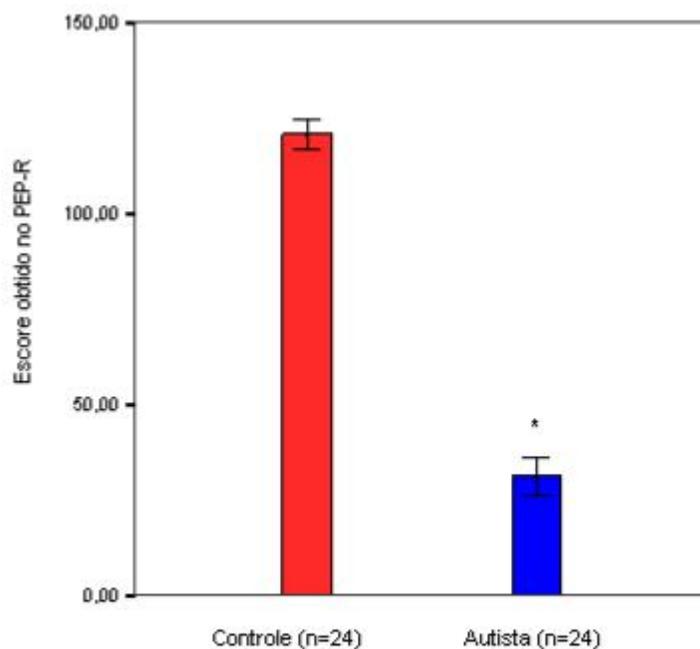


Gráfico 1- Pontuação obtida pelos indivíduos pertencentes aos grupos controle e de pacientes autistas nas escalas de desenvolvimento do PEP-R. Resultados expressos como média, * $p < 0,001$.

A partir do escore de pontos obtido por cada criança, utilizando-se a Tabela do Anexo E, foi possível aferir a idade de desenvolvimento. Como exposto na Tabela 2, a média da idade de desenvolvimento do grupo controle foi de $66,54 \pm 15,97$ e do grupo de pacientes foi de $16,64 \pm 8,91$.

Tabela 2 – Parâmetros psicométricos* dos participantes pertencentes ao grupo controle e de pacientes autistas.

Grupos	Idade de desenvolvimento (meses)	Quociente de desenvolvimento
Controle (n=24)	$66,54 \pm 15,97$	--
Paciente (n=24)	$16,64 \pm 8,91$	$20,63 \pm 13,79$

* Resultados expressos como média \pm desvio-padrão.

Os pacientes foram divididos em dois grupos, de acordo com os valores do quociente de desenvolvimento, a fim de possibilitar a avaliação de correlações entre o perfil de desenvolvimento das crianças e os demais parâmetros analisados. No subgrupo com $QD < 15$ (n=11) a média foi de $10,42 \pm 4,18$, com uma distribuição de 4 meninas e 7 meninos, e no subgrupo com $QD > 15$ (n=13) a média foi de $29,26 \pm 13,18$, com uma distribuição de 2 meninas e 11 meninos.

6.3 ANÁLISES LABORATORIAIS

6.3.1 Dosagem de citocinas

Os níveis séricos de IFN- γ foram significativamente elevados entre as crianças autistas ($81,5 \pm 27,1$ pg/mL) em comparação com o grupo controle ($51,46 \pm 20,31$ pg/mL) ($p=0,030$) (Tabela 3).

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados para os níveis séricos de TNF- α ($p=0,56$), IL-10 ($p=0,36$), IL-6 ($p=0,63$), IL-4 ($p=0,09$) e IL-2 ($p=0,18$) (Tabela 3).

Tabela 3 – Níveis séricos de citocinas nos grupos controle e de pacientes autistas.

Grupos	IFN- γ (pg/mL)	TNF- α (pg/mL)	IL-10 (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)	IL-4 (pg/mL)	IL-2 (pg/mL)
Controle (n=24)	51,46 \pm 20,31	16,2 \pm 6,7	7,5 \pm 2,2	10,6 \pm 4,3	46,9 \pm 21,5	38,3 \pm 15,3
Paciente (n=24)	81,5 \pm 27,1	14,8 \pm 5,4	7,3 \pm 2,5	12,5 \pm 7,5	48,2 \pm 16,2	40,9 \pm 17,3

*Resultados são expressos como média \pm desvio-padrão.

Entre as crianças autistas, mas não no grupo controle, houve uma correlação positiva entre os níveis plasmáticos de NO e IFN- γ ($r= 0,60$; $p= 0,005$). Não houve correlação significativa entre os níveis plasmáticos de NO e das demais citocinas

Não foi observada correlação entre a pontuação média obtida através do PEP-R pelos grupos estudados e os níveis séricos de IFN- γ ($p=-0,71$; $r=0,632$), TNF- α ($p=0,196$; $r=0,190$), IL-10 ($p=0,820$; $r=0,034$), IL-6 ($p=0,511$; $r=-0,097$), IL-4 ($p=0,765$; $r=0,45$) e IL-2 ($p=0,794$; $r=0,039$).

Não foram evidenciadas diferenças e correlações significativas entre os quocientes de desenvolvimento (QD) das crianças autistas e os níveis séricos de INF- γ ($p=0,098$; $r=0,664$), TNF- α ($p=0,721$; $r=0,081$), IL-10 ($p=0,727$; $r=0,079$), IL-6 ($p=0,988$; $r=0,003$); IL-4($p=0,491$; $r=0,159$) e IL-2 ($r=0,580$; $r=0,125$) e os níveis plasmáticos de óxido nítrico ($p=0,192$; $r=0,289$).

A partir dos dados obtidos de quociente de desenvolvimento (QD), as crianças autistas foram subdivididas em 2 grupos, a saber: $QD < 15$ ($n=11$) e $QD > 15$ ($n=13$). Posteriormente, foi feita a análise para verificação de possível correlação entre estes 2 subgrupos e os parâmetros laboratoriais de interesse. Não foram evidenciadas diferenças e correlações significativas entre os subgrupos e os níveis séricos de INF- γ ($p= 0,21$), TNF- α ($0,56$), IL-10 ($p=0,36$), IL-6 ($p=0,63$); IL-4($p=0,09$) e IL-2 ($p=0,18$) e os níveis plasmáticos de óxido nítrico ($p=0,02$).

6.3.2 Quantificação de ácidos graxos por cromatografia gasosa

Os resultados a seguir foram expressos como peso percentual total de ácidos graxos. Os níveis plasmáticos de ARA estavam significativamente elevados no grupo de crianças autistas ($16,82 \pm 1,04$) em comparação com as crianças do grupo controle ($12,26 \pm 1$) ($p < 0,001$). Os níveis plasmáticos de EPA estavam significativamente reduzidos no grupo de crianças autistas ($0,76 \pm 0,20$) em comparação com o grupo controle ($1,24 \pm 0,27$) ($p < 0,001$), o mesmo ocorrendo com os níveis plasmáticos de DHA no grupo de crianças autistas ($3,67 \pm 0,65$) em comparação com o grupo controle ($4,95 \pm 0,65$) ($p < 0,001$). Os resultados estão demonstrados no Gráfico 2.

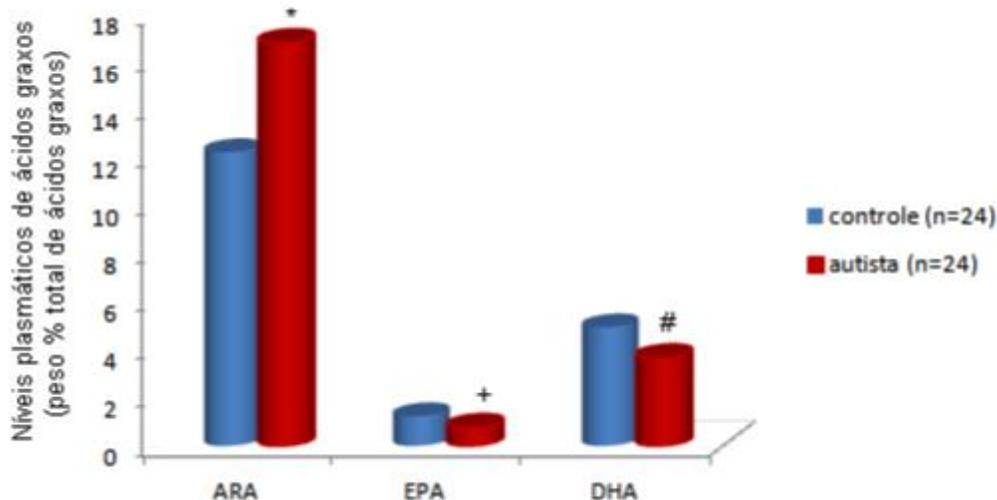


Gráfico 2- Níveis plasmáticos de ARA, EPA e DHA nos grupos controle e de pacientes autistas. Resultados expressos como peso percentual do total de ácidos graxos, *^{+#} $p < 0,001$. ARA = ácido araquidônico, EPA = ácido eicosapentaenóico e DHA= ácido docosahexaenóico.

A análise das correlações entre os níveis plasmáticos dos ácidos graxos ARA, EPA e DHA nos grupos estudados revelou elevação das taxas de ARA:EPA e ARA:DHA no grupo de criança autistas em relação ao grupo controle ($p < 0,05$), e redução das taxas de EPA:ARA e EPA:DHA no grupo de crianças autistas em relação ao grupo controle ($p < 0,005$).

Não foi observada correlação entre o quociente de desenvolvimento obtido através da aplicação do PEP-R no grupo de crianças autistas e os níveis plasmáticos de ARA ($p = 0,81$; $r = -0,05$), EPA ($p = 0,39$; $r = -0,18$) e DHA ($p = 0,70$; $r = -0,08$) no mesmo grupo.

A análise para verificação de possíveis correlações entre os 2 subgrupos de crianças autistas com $QD < 15$ ($n = 11$) e $QD > 15$ ($n = 13$) e os níveis plasmáticos de ARA ($p = 0,90$), EPA ($p = 0,92$) e DHA ($p = 0,15$) não revelou resultados significativos.

6.3.3 Dosagem de PLA₂

A atividade de PLA₂ foi significativamente maior no grupo de crianças autistas (170 ± 10 pMol/min/mL, $n=24$), quando comparada com a atividade no grupo controle (132 ± 8 pMol/min/mL, $n=24$) ($p < 0,05$) (Gráfico 3).

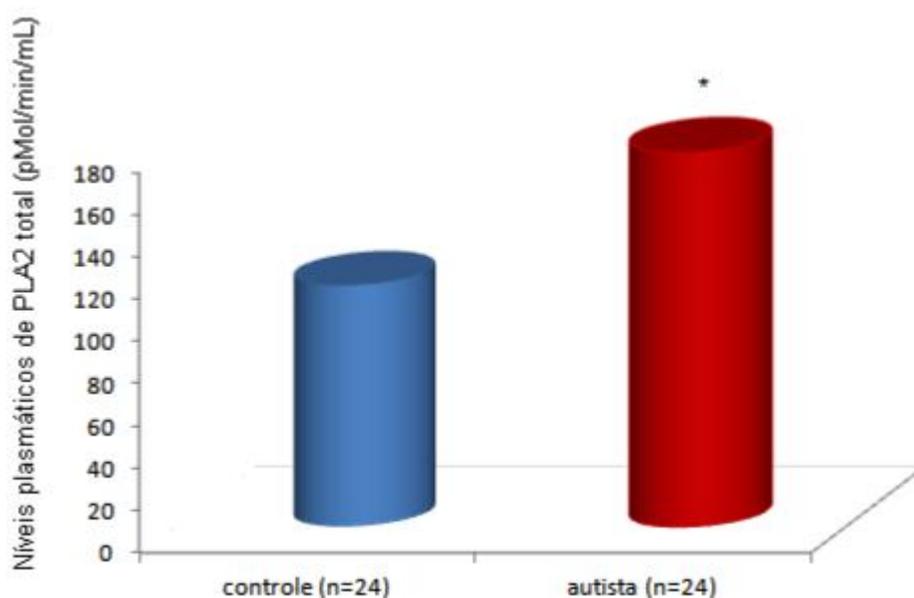


Gráfico 3 – Níveis plasmáticos de PLA₂ nos grupos controle e de pacientes autistas. Resultados expressos como média, * $p < 0,05$.

6.3.4 Dosagem de óxido nítrico

Os níveis plasmáticos de óxido nítrico foram significativamente maiores no grupo de crianças autistas ($47,3 \mu\text{mol/L} \pm 5,1 \mu\text{mol/L}$), quando comparados com os níveis do grupo controle ($35,7 \mu\text{mol/L} \pm 4,2 \mu\text{mol/L}$) ($p=0,004$ - Gráfico 4).

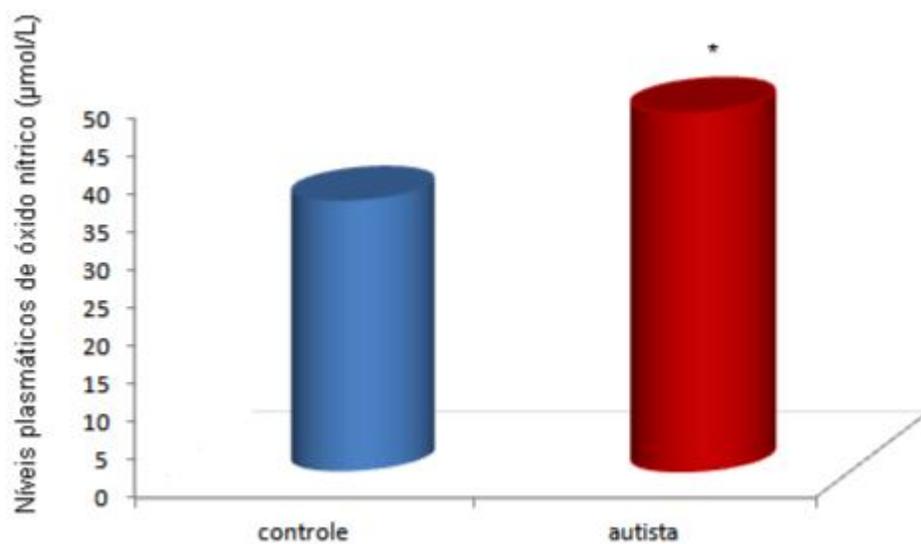


Gráfico 4 – Níveis plasmáticos de óxido nítrico nos grupos controle e de pacientes autistas. Resultados expressos como média, * $p = 0,004$.

7- DISCUSSÃO

Este estudo objetivou avaliar a ocorrência de possíveis alterações nos níveis séricos de citocinas e nos níveis plasmáticos de óxido nítrico e fosfolípides em crianças que apresentam autismo, e investigar se haveria correlação entre essas alterações e os déficits nos perfis de desenvolvimento das crianças.

Como as crianças autistas encaminhadas para o estudo procederam de várias instituições, a partir de um convite dos profissionais, a amostra se compôs progressivamente, de acordo com a aceitação voluntária das famílias atendidas.

Os dados demográficos revelaram uma maior participação de crianças do sexo masculino nessa amostra clínica, em uma proporção de 3:1, o que coincide com a maior incidência de autismo em meninos, com proporções médias relatadas de 3,5 a 4 meninos para cada menina (KLIN, 2006). Considerando que essa proporção pode variar em função do grau de funcionamento intelectual, os dados desse estudo evidenciaram que entre as 6 meninas com autismo, uma apresentou idade de desenvolvimento igual a 34 e as demais apresentaram idade de desenvolvimento menor que 18. Entre as meninas do grupo controle, uma apresentou idade de desenvolvimento igual a 73 e as demais idade de desenvolvimento igual a 77, referência superior dos resultados. Quando as crianças do grupo de pacientes foram divididas de acordo com o quociente de desenvolvimento, observamos uma distribuição de 4 meninas e 7 meninos incluídos no subgrupo com maior déficit no desenvolvimento ($QD < 15$). No subgrupo com maior quociente de desenvolvimento ($QD > 15$), observamos 2 meninas e 11 meninos. Os dados sugerem que nesse estudo há uma alteração da proporção entre os sexos, com maior representação do sexo feminino, quando consideramos crianças com maior déficit nos padrões de aprendizagem, tal como apontada por Klin (2006).

Alguns trabalhos citados anteriormente formaram grupos amostrais com crianças com idade média de $6,1 \pm 2,8$ anos, com variação de 2 a 12 anos (SWEETEN et al., 2004), de $6,9 \pm 2,0$ anos, com variação de 3 a 10 anos (MOLLOY et al., 2006) e de 7,6, com variação de 2 a 13 anos (JYONOUCHI et al., 2008). Neste presente estudo, a idade média das crianças nos dois grupos foi $7,41 \pm 2,9$ anos, com variação de 2 a 12 anos.

A pequena participação de crianças de 2 ($n=1$) e 3 anos ($n=2$) justifica-se pela dificuldade com a identificação precoce dos indivíduos que apresentam autismo, embora os pais se

sensibilizem com os atrasos no desenvolvimento de seus filhos muito precocemente. Todas as histórias clínicas das crianças avaliadas no estudo incluíam os relatos dos familiares sobre o percurso para o recebimento do diagnóstico de autismo, com a necessidade de vários encaminhamentos a profissionais de diferentes especialidades, antes que houvesse uma definição. Alguns pais ainda permaneciam sem a definição do diagnóstico, embora as crianças estivessem em atendimento por serviços especializados.

De acordo com Aman, Lam e Collier-Crespin (2003), é estimado que 46% das crianças com transtornos globais do desenvolvimento são tratadas com psicofármacos para o controle de algum sintoma. Os dados do nosso estudo revelaram que, entre as 24 crianças do grupo de casos, 21 (87,5%) faziam uso de psicofármacos, sendo que 14 crianças utilizavam dois ou mais psicofármacos, prescritos com o propósito de redução dos sintomas associados ao quadro de autismo. Mesmo considerando que foram incluídas apenas crianças com autismo, e não crianças com os demais transtornos de espectro do autismo, a frequência das prescrições parece elevada e poderia estar relacionada à deficiente implementação das ações de saúde, associada à carência da oferta de atendimentos especializados no nosso meio (TOSTES, 2007).

Como não foi possível excluir as crianças que estavam em tratamento medicamentoso, o uso de psicofármacos poderia se constituir como uma variável capaz de interferir com os resultados das análises laboratoriais e com o comportamento das crianças durante a avaliação do desenvolvimento. No entanto, Molloy e colaboradores (2006) avaliaram os níveis de citocinas (IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13) entre crianças com transtornos globais do desenvolvimento e verificaram que 65% delas estavam em tratamento com psicofármacos; mas os níveis das referidas citocinas não foram estatisticamente diferentes entre crianças com transtornos globais do desenvolvimento em uso ou não de psicofármacos.

Os níveis plasmáticos de citocinas estão significativamente aumentados em pacientes psiquiátricos tratados com clozapina, lítio ou benzodiazepínicos (HAACK et al., 1999; POLLMACHER et al., 2000). No nosso estudo não havia crianças tratadas com esses fármacos.

Segundo Basterzi e colaboradores (2005), os níveis séricos de IL-6 em 23 pacientes com Transtorno depressivo maior não diferiram significativamente dos níveis dos controles; mas após o tratamento com inibidores seletivos de recaptção de serotonina, os níveis séricos de IL-6 estavam significativamente reduzidos, quando comparados com os níveis basais dos pacientes e dos controles.

Risperidona (6 mg/dia) e haloperidol (20 mg/dia) reduzem as concentrações séricas de IL-2 em pacientes esquizofrênicos após 12 semanas de tratamento, mas nenhuma influência significativa foi notada na redução dos níveis de IL-6 ou IL-8 para esses pacientes (ZHANG et al., 2004). Entre as crianças avaliadas, 8 crianças tomavam risperidona, em doses que variavam entre 0,5 a 3 mg/dia e 6 faziam uso de haloperidol, em doses de 1,5 a 3 mg/dia.

As crianças com autismo apresentam um risco maior para a ocorrência de convulsões, as quais ocorrem em pelo menos 1/3 dos casos (POMEROY, 1992; TUCHMAN; RAPIN, 2002). Os nossos dados demonstraram que 37,5% dos pacientes apresentaram história de crises convulsivas. Considerando que o risco é ainda maior na adolescência, padrão diverso da população, na qual o risco de convulsões reduz com a idade, podemos esperar uma incidência ainda maior com a evolução do quadro a partir dos 12 anos.

Leon e colaboradores (2004) ressaltaram que as crianças autistas têm sido consideradas “não-testáveis”, quando submetidas às avaliações psicométricas, devido à dificuldade em interagir com o examinador, pela cooperação limitada durante a execução das tarefas ou mesmo pela dificuldade do examinador em compreender essas crianças.

A fragmentação do aprendizado observado entre as crianças autistas, que dificulta a conclusão das atividades e da comunicação, resulta da preferência por raciocínios repetitivos e sequências, com déficit nas tarefas de raciocínio e integração. Adicionalmente, observa-se uma variação nas habilidades cognitivas, com resultados normais nos testes de inteligência padronizados em 30% dos casos e resultados em nível de deficiência em 70% dos casos (GILLBERG, 1990). Entre as crianças com retardo mental, 50% apresentam grau leve.

As dificuldades para aplicação dos instrumentos de avaliação são acrescidas pelas variações na expressão do quadro clínico do autismo, que ocorrem entre as crianças e para a mesma criança em ocasiões diferentes, e as amplas variações individuais nas áreas de habilidades e nas áreas deficitárias.

Vários instrumentos são utilizados para complementar a avaliação diagnóstica, tais como entrevistas envolvendo familiares, escalas e inventários para a avaliação de comportamento, mas as limitações em sua aplicação têm sido pouco avaliadas. Marteleto e colaboradores (2008) avaliaram a concordância das respostas no Inventário de comportamentos autísticos de mães e profissionais de crianças pertencentes ao espectro do autismo e concluíram que o índice de concordância foi baixo, com diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos.

A opção apenas pela inclusão de crianças com quadros típicos de autismo e a exclusão dos demais quadros de transtornos globais do desenvolvimento implicou em uma dificuldade adicional para a avaliação da capacidade cognitiva. No entanto, a aplicação do PEP-R, como instrumento de medida da idade de desenvolvimento e de identificação de padrões irregulares de aprendizagem, revelou-se satisfatória para a avaliação de todas as dimensões, independente da faixa etária, da capacidade de interagir e de se comunicar com o examinador. Todas as 24 crianças com autismo participaram das avaliações ativamente, nem sempre cooperativamente, tolerando o período de espera necessário à mesma, e as condutas de evitação e comportamentos disfuncionais não impediram a conclusão das tarefas.

Leon e colaboradores (2004) encontraram como escores brutos das escalas de desenvolvimento do PEP-R média de 57,4 pontos para os pacientes e de 118,0 pontos para o grupo controle. Nossos resultados demonstraram que o grupo de pacientes obteve média de pontos igual a $31,12 \pm 23,75$ e o grupo controle média de pontos igual a $120,79 \pm 19,21$. A maior média de pontos nos grupos de crianças com autismo no trabalho de Leon e colaboradores (2004) em relação à média do nosso trabalho pode estar relacionada à faixa etária das crianças incluídas no primeiro estudo (5-9 anos), em comparação com a nossa (2-12 anos).

Ainda de acordo com as variações previstas nas habilidades cognitivas entre as crianças com autismo, observamos resultados discrepantes entre os quocientes de desenvolvimento, variando de 2,17 para uma criança de 9 anos a 58,10 para uma criança de 6 anos.

Embora a etiologia do autismo permaneça desconhecida, a ocorrência de alterações imunológicas tem sido amplamente investigada em associação com o quadro clínico (COHLY; PANJA, 2005; VODJANI et al, 2008). No entanto, os trabalhos têm revelado resultados pouco consistentes, quando avaliados os níveis de marcadores de ativação imunológica em crianças autistas, tais como aumento dos níveis plasmáticos de IL-12 e IFN- γ (SINGH, 1996), aumento apenas dos níveis de TNF- α nas células mononucleares do sangue periférico (JYONOUCHI; SUN; LE, 2001), aumento dos níveis de IFN- γ , TNF- α e IL-6 no sangue total (CROONENBERGHS et al., 2002), aumento dos níveis séricos de receptor II de TNF (ZIMMERMAN et al., 2005) e aumento dos níveis de IL-4, IL-5 e IL-13 nas células mononucleares do sangue periférico (MOLLOY et al., 2006).

A interpretação dos resultados torna-se especialmente difícil pela não padronização dos critérios de seleção das amostras. Entre os trabalhos citados, a metade deles incluiu crianças com

autismo e a outra metade crianças com transtornos do espectro do autismo. Nesse último grupo, estão as crianças com transtorno de Asperger, quadro clínico que difere do autismo por incluir níveis superiores de habilidades cognitivas e comunicativas.

No estudo de Sweeten e colaboradores (2004) os níveis plasmáticos das citocinas não diferiram entre os grupos de crianças com autismo e controle. Ao discutir os dados, os autores mencionam a possível relação entre os resultados obtidos para a dosagem de citocinas e a técnica empregada, pois no trabalho de Croonenberghs e colaboradores (2002) houve alteração dos níveis de citocinas quando utilizado sangue total, mas não quando avaliados os níveis séricos.

A elevação dos níveis plasmáticos de IFN- γ nas crianças autistas do nosso estudo é consistente com os relatos de Croonenberghs e colaboradores (2002), utilizando sangue total, e de Jyonouchi, Sun e Le (2001) nas células mononucleares do sangue periférico, os quais no entanto, em contraste com o nosso resultado, encontraram níveis elevados de IFN- γ , TNF- α e IL-1 β .

Níveis elevados de óxido nítrico têm sido relacionados à patogênese do autismo como evidenciado por Sogut e colaboradores (2003), Zoroglu e colaboradores (2003) e Sweeten e colaboradores (2004). O último estudo revelou uma correlação positiva entre os níveis plasmáticos dos metabólitos de NO e de IFN- γ , sugerindo que a produção elevada de óxido nítrico possa ser secundária à indução da enzima sintetizadora de óxido nítrico, mediada pelo IFN- γ . A produção aumentada de NO no cérebro poderia alterar as conexões sinápticas cerebrais e o neurodesenvolvimento, possivelmente contribuindo para a fisiopatologia do autismo.

Nossos achados de níveis plasmáticos de NO elevados e de uma correlação positiva entre níveis de NO e IFN- γ em nossas crianças autistas replicam os resultados dos trabalhos mencionados.

Em relação aos resultados de fosfolípidos, observamos que os elevados níveis plasmáticos de ARA e os níveis reduzidos de EPA e DHA no grupo de crianças autistas em relação ao grupo controle, são concordantes com as evidências de alteração do metabolismo lipídico, observadas em transtornos neuropsiquiátricos. Tem sido proposto que tal desequilíbrio estaria relacionado a alterações da estrutura e função da membrana celular fosfolipídica, o qual seria semelhante entre vários transtornos do desenvolvimento (BELL et al., 2000).

Particularmente, os níveis de EPA estão associados com a produção de eicosanóides com propriedades anti-inflamatórias, anti-trombóticas e vasodilatadoras (EL-ANSARY; BEM

BACHA; AL-AYAHDI, 2011a), os quais estavam reduzidos nas crianças autistas do nosso estudo.

Os nossos resultados são concordantes com o trabalho de Bell e colaboradores (2010), com elevação da taxa de ARA:EPA nos eritrócitos e plasma de crianças autistas pareadas por idade com crianças em desenvolvimento típico. No entanto, são discordantes dos resultados de EL-ANSARY, BEN BACHA E AL-AYAHDI (2011b), os quais encontraram taxas reduzidas de ARA:DHA e elevadas de EPA:ARA. Os autores sugeriram que os seus resultados poderiam ser explicados pelas flutuações de EPA e DHA de acordo com a dieta dos pacientes, enquanto os níveis de ARA permaneceriam em concentrações relativamente estáveis.

Considerando que a oferta de ômega-3 está relacionada à melhora comportamental em escala de avaliação aplicada a crianças autistas (MEIRI; BICHOVSKY; BELMAKER, 2009), e que os pacientes que receberam suplemento de EPA apresentaram concentrações reduzidas de PLA₂, quando comparados com os pacientes que não receberam tal suplemento (BELL et al., 2004), esclarecemos que as crianças participantes do estudo não estavam fazendo uso de qualquer suplemento dietético.

A elevação dos níveis de atividade de PLA₂ nas crianças autistas observada no nosso estudo é concordante com relato de Bell e colaboradores (2004), contribuindo para considerarmos a associação da aceleração do metabolismo de fosfolípides com as alterações bioquímicas da membrana lipídica.

El-Ansary, Ben Bacha e Al-Ayahdi (2011a), ao discutirem a elevação dos níveis de ácidos graxos saturados, especialmente do ácido valérico, no plasma de crianças autistas, apontam a relação de tal elevação com o estresse oxidativo.

Adicionalmente, Bell e colaboradores (2004) sugerem que o aumento de atividade de PLA₂ estaria associado ao aumento do estresse oxidativo, resultando na instabilidade do perfil de ácidos graxos. Nossos resultados, apontando o aumento dos níveis plasmáticos de NO nas mesmas crianças autistas poderá contribuir para a consideração de tal hipótese.

8- CONCLUSÃO

As crianças autistas apresentam alterações na resposta imunológica, no metabolismo de fosfolípidos e no perfil de desenvolvimento.

Nossos resultados sugerem uma associação do estresse oxidativo com desregulação imune e alteração do metabolismo lipídico no autismo infantil. No entanto, não foi evidenciada uma correlação entre esses parâmetros e o perfil de desenvolvimento das crianças com autismo.

REFERÊNCIAS

AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. Pathogen recognition and innate immunity. **Cell**, v. 124, p. 783-801, 2006.

AMAN, M.G.; LAM, K.S.; COLLIER-CRESPIN, A. Prevalence and patterns of use of psychoactive medicines among individuals with autism in the Autism Society of Ohio. **J Autism Dev Disord**, v. 33, p. 911-920, 2003.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Edition**. Washington, DC: American Psychiatric Association, 1994.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Edition, Text Revised**. Washington, DC: American Psychiatric Association, 2000.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Third Edition**. Washington, DC: American Psychiatric Association, 1980.

ARAI, K.; WATANABE, S.; KOYANO, N. et al. Cytokine network: control of allergic response and hemopoiesis by hemopoietic growth factors. **J Dermatol**, v. 19, p. 575-583, 1992.

ASHWOOD, P.; WILLS, S.; VAN DER WATER, J. The immune response in autism; a new frontier for autism research. **J Leukocyte Biol**, v. 80, p. 1-15, 2006

ASSUMPÇÃO JÚNIOR, F. B.; KUCZYNSKI, E. Diagnóstico diferencial psiquiátrico no autismo. **Revista Debates Psiquiatria**, v. 3, p. 12-19, 2011.

BAILEY, A.; PALFERMAN, S.; HEASEY, L. et al. Autism: the phenotype in relatives. **J Autism Dev Disord**, v. 28, n. 5, p. 369-392, 1998.

BASS, M.P.; MENOLD, M.M.; WOLPERT, C.M. et al. Genetic studies in autistic disorder and chromosome 15. **Neurogenetics**, v. 2, n. 4, p. 219-226, 2000.

BASTERZI, A.D.; AYDEMIR, C.; KISA, C. et al. IL-6 levels decreased with SSRI treatment in patients with major depression. **Hum Psychopharmacol**, v. 20, p. 473-476, 2005.

BAZAN, N.G.; TU, B.; RODRIGUEZ de TURKO, E.B. What synaptic lipid signaling tells us about seizure-induced damage and epileptogenesis. **Prog Brain Res**, v. 135, p. 175-185, 2002.

BELL, J.G.; MACKINLAY, E.E.; DICK, J.R. et al. Essential fatty acids and phospholipase A2 in autistic spectrum disorders. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v. 71, p. 201-204, 2004.

BELL, J.G.; MILLER, D.; MacDONALD, D.J. et al. The fatty acid compositions of erythrocyte and plasma polar lipids in children with autism, developmental delay or typically developing controls and the effect of fish oil intake. **Br J Nutr**, v. 103, n. 8, p. 1160-1167, 2010.

BELL, J.G.; SARGENT, J.R.; TOCHER, D.R. et al. Red blood cell fatty acid compositions in a patient with autistic spectrum disorder: a characteristic abnormality in neurodevelopmental disorders. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v. 63, n. 1/2, p. 21-25, 2000.

BLAYLOCK, R.L. A possible central mechanism in autism spectrum disorders, part 2: immunoexcitotoxicity. **Alternative Therapies**, v. 15, n. 1. p. 60-67, 2009a.

BLAYLOCK, R.L. A possible central mechanism in autism spectrum disorders, part 3: the role of excitotoxin food additives and the synergistic effects of other environmental toxins. **Biological Sciences**, v. 15, n. 2. p. 56-60, 2009b.

BLAYLOCK, R.L., STRUNECKA, A. Immune-glutamatergic dysfunction as a central mechanism of the autism spectrum disorders. **Biological Sciences**, v. 16, n. 2, p. 157-170, 2009.

BOSA, C.A. Autismo: Intervenções psicoeducacionais. **Rev Bras Psiquiatr**, v. 28 (suppl I), p. 47-53, 2006.

BOWMAN, E.P. Asperger's syndrome and autism: The case for a connection. **Brit J Psychiat**, v. 152, n. 3, p. 377-382, 1988.

BRASIL, H.H.A. Avaliação diagnóstica em Psiquiatria da infância e da adolescência. In: BRASIL, M.A.A.; BOTEGA, N.J. (Eds.). **Programa de educação continuada**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p.168-175.

BRUNE, C; KIM, S.J.; SALT, J. et al. 5-HTTLPR genotype-specific phenotype in children and adolescents with autism. **Am J Psychiatry**, v. 163, n. 12, p. 2148-2156, 2006.

CARVALHEIRA, G.; VERGANI, N.; BRUNONI, D. Genética do autismo. **Rev Bras Psiquiatr**, v. 26, n. 4, p. 270-272, 2004.

CHAUHAN, A.; CHAUHAN, V.; BROWN, W.T. et al. Oxidative stress in autism: increased lipid peroxidation and reduced serum levels of ceruloplasmin and transferrin- the antioxidant proteins. **Life Sci**, v. 75, p. 2539-2549, 2004.

CLARK, J.D.; LIN, L.L.; KRIZ, R.W., et al. A novel arachidonic acid-selective cytosolic PLA₂ contains a Ca²⁺-dependent translocation domain with homology to PKC and GAP. **Cell**, v. 65, p. 1043-1051, 1991.

COHLY, A.A.; PANJA, A. Immunological findings in autism. **Int Rev Neurobiol**, v. 71, p. 317-341, 2005.

COOK, E.H.; LINDGREN, V.; LEVENTHAL, B.L. et al. Autism or atypical autism in maternally but not paternally derived proximal 15q duplication. **Am J Hum Genet**, v. 60, n. 4, p. 928-934, 1997.

CORBETT, J. Development, desintegration and dementia. **J Ment Defic Res**, v. 31, p. 349-356, 1987.

COYLE, J.T.; DUMAN, R.S. Finding the intracellular signaling pathways affected by mood disorder treatments. **Neuron**, v. 38, p. 157-160, 2003.

CROONENBERGHS, J.; BOSMANS, E.; DEBOUTTE, D. et al. Activation of the inflammatory response system in autism. **Neuropsychobiology**, v.45, n.1, p. 1-6, 2002.

DEMYER, M.K.; HINGTGEN, JN; JACKSON, R.K. Infantile autism reviewed: A decade of research. **Schizophr Bull**, v. 7, p. 388-451, 1981.

DINARELLO, C. A. Proinflammatory cytokines. **Chest**, v. 118, p. 503-508, 2000.

DIVECHA, N.; IRVINE, R.F. Phospholipid signaling. **Cell**, v. 27, n. 80 (suppl 2), p. 269-278, 1995.

DUMUIS, A.; SEBBEN, M.; BOCKAERT, J. Pharmacology of 5-hydroxytryptamine-1A receptors which inhibit cAMP production in hippocampal and cortical neurons in primary culture. **Mol Pharmacol**, v. 33, p. 178-186, 1988.

EL-ANSARY, A.K.; BEN BACHA, A.G.; AL-AYAHDI, L.Y. Impaired plasma phospholipids and relative amounts of essential polyunsaturated fatty acids in autistic patients from Saudi Arabia. **Lipids in Health and Disease**, v. 10, n.63, 2011b.

EL-ANSARY, A.K.; BEN BACHA, A.G.; AL-AYAHDI, L.Y. Plasma fatty acids as dignostic markers in autistic patients from Saudi Arabia. **Lipids in Health and Disease**, v. 10, n. 62, 2011a.

FAROOQUI, A.A.; HORROCKS, L.A.; FAROOQUI, T. Deacylation and reacylation of neuronal membrane glycephospholipids: A matter of life and death. **J Mol Neurosci**, v.14, p. 123-135, 2000a.

FAROOQUI, A.A.; HORROCKS, L.A.; FAROOQUI, T. Glycerophospholipids in brain: Their metabolism, incorporation into membranes, functions, and involvement in neurological disorders. **Chem Phys Lipids**, v. 106, p. 1-29, 2000b.

FAROOQUI, A.A.; ONG, W.; HORROCKS, L.A. Inhibitors of brain phospholipase A2 activity: Their neuropharmacological effects and therapeutic importance for the treatment of neurological disorders. **Pharmacol Rev**, v. 58, p. 591-620, 2006.

FAROOQUI, A.A., YANG, H.C., ROSENBERG, T.A., HORROCKS, L.A. Phospholipase A₂ and its role in brainissue. **J Neurochem**, v. 69, n. 3, p. 889-901, 1996.

FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G.H.S. A simple method for the isolation and purification of lipids from animal tissues. **J Biol Chem**, v. 226, p. 497-509, 1957.

FOLSTEIN, S.E.; BISSON, E.; SANTAGELO, S.L. et al. Finding specific genes that cause autism: a combination of approaches will be needed to maximize power. **J Autism Dev Disord**, v. 28, p. 439-445, 1998.

FOLSTEIN, S.E.; ROSEN-SHEIDLEY, B. Genetics of autism: complex aetiology for a heterogeneous disorder. **Nat Rev Genet**, v. 2, n. 12, p. 943-955, 2001.

FOMBONNE, E. Epidemiology of autistic disorder and other pervasive developmental disorders. **J Clin Psychiatry**, v. 66 (suppl 10), p. 3-8, 2005.

FORLENZA, O.V.; SCHAEFFER, E.L., GATTAZ, W.F. The role of phospholipase A₂ in neuronal homeostasis and memory formation: implications for the pathogenesis of *Alzheimer's* disease. **J Neural Transm**, v. 114, n. 2, p. 231-238, 2007.

FRAZER, A. Norepinephrine involvement in antidepressant action **J Clin Psychiatry**, v. 61, p. 25-30, 2000.

GATTAZ, W.F.; CAIRNS, N.J.; LEVY, R. et al. Decreased phospholipase A₂ activity in the brain and in platelets of patients with Alzheimer's disease. **Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci**, v. 246, n. 3, p. 129-131, 1996.

GATTAZ, W.F., HÜBNER, C.K.; NEVALAINEN, T.J. et al. Increased serum phospholipase A₂ activity in schizophrenia: a replication study. **Biol Psychiatry**, v. 28, p. 495-501, 1990.

GATTAZ, W.F.; KÖLLISCH, M.; THUREN, T. et al. Increased plasma phospholipase-A₂ activity in schizophrenic patients: reduction after neuroleptic therapy. **Biol Psychiatry**, v. 22, p. 421-426, 1987.

GATTAZ, W.F.; MARAS, A.; CAIRNS, N.J. et al. Decreased phospholipase A₂ activity in Alzheimer brains. **Biol Psychiatry**, v. 37, p.13-17, 1995.

GATTAZ, W.F.; STEUDLE, A.; MARAS, A. Increased platelet phospholipase A₂ in schizophrenia. **Schizophr Res**, v. 16, p. 1-6, 1995.

GATTAZ, W.F.; VALENTE, K.D.; RAPOSO, N.R.B. et al. Increased PLA₂ activity in the hippocampus of patients with temporal lobe epilepsy and psychosis. **J Psychiatric Res**, v. 45, n. 12, p. 1617-1620, 2011.

GLEN, A.I.; GLEN, E. M.; HORROBIN, D.F. et al. A red cell membrane abnormality in a subgroup of schizophrenic patients : evidence for two diseases. **Schizophrenia Research**, v. 12, p. 53-61, 1994.

GILLBERG, C. Autism and pervasive developmental disorders. **J Child Psychol Psychiat**, v. 31, p. 99-119, 1990.

GILLBERG, C. Chromosomal disorders and autism. **J Autism Dev Disord**, v. 28, p. 415-425, 1998.

GREEN, L.C.; WAGNER, D.A.; GLOGOWSK, J. et al. Analysis of nitrate, nitrite and [15] nitrate in biological fluids. **Anal Biochem**, v. 126, p. 131-138, 1982.

HAACK, M.; HINZE-SELCH, D.; FENZEL, T. et al. Plasma levels of cytokines and soluble cytokine receptors in psychiatric patients upon hospital admission: effects of confounding factors and diagnosis. **J Psychiatr Res**, v. 33, p. 407-418, 1999.

HASIN, D.S.; GOODWIN, R.D.; STINSON, F.S.; GRANT, B.F. Epidemiology of major depressive disorder: results from the National epidemiologic survey on alcoholism and related conditions. **Arch Gen Psychiatry**, v. 62, p. 1097-1106, 2005.

HERMELIN, B. **Bright splinters of the mind: a personal story of research with autistic savants**. London: Jessica Kingsley Publishers, 2001. 188p.

HERTZ-PICCIOTTO, I.; CROEN, L.A.; HANSEN, R. et al. The CHARGE study: An epidemiologic investigation of genetic and environmental factors contributing to autism. **Environmental Health Perspectives**, v. 114, n. 7, p. 1119-1125, 2006.

HIBBELN, J.R.; PALMER, J.W.; DAVIS, J.M. Are disturbances in lipid-protein interactions by phospholipase A₂ a predisposing factor in affective illness. **Biol Psychiatry**, v. 25, p. 945-961, 1989.

HINSBERGER, A.D.; WILLIAMSON, P.C.; CARR, T.J. et al. Magnetic resonance imaging volumetric and phosphorus 31 magnetic resonance spectroscopy measurements in schizophrenia. **J Psychiatry Neurosci.**, v. 22, n. 2, p. 111-117, 1997.

HOPKINS, S.J. The pathophysiological role of cytokines. **Leg Med (Tokyo)**, v. 5 (suppl 1), p. 45-47, 2003.

HORROBIN, D.F. The membrane phospholipids hypothesis as a biochemical basis for the neurodevelopmental concept of schizophrenia. **Schizophr Res**, v. 30, n. 3, p. 193-208, 1998.

HORROBIN, D.F.; BENNETT, C.N. New gene targets relates to schizophrenia and other psychiatric disorders: enzymes, binding proteins and transport proteins involved in phospholipid and fatty acid metabolism. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v. 60, n. 3, p. 141-167, 1999.

HORROBIN, D.F.; MANKU, M.S.; HILLMAN, H. et al. Fatty acid levels in the brains of schizophrenics and normal controls. **Biol Psychiatry**, v. 15, n. 30 (suppl 8), p. 795-805, 1991.

HORROBIN, D.F.; GLEN, A.I.; HUDSON, C.J. Possible relevance of phospholipid abnormalities and genetic interactions in psychiatric disorders: the relationship between dyslexia and schizophrenia. **Med Hypotheses**, v. 45, n.6, p. 605-613, 1995.

HOWLIN, P. Outcomes in autism spectrum disorders. In: VOLKMAR, F.; PAUL, R.; KLIN, A.; COHEN, D. (Eds.). **Handbook of autism and pervasive developmental disorders**. 3rd ed. New York: Wiley, 2005. Volume 1, Section I, Chapter 7, p. 201-221.

JAMES, S.J.; CUTLER, P.; MELNYK, S. et al. Metabolic biomarkers of increased oxidative stress and impaired methylation capacity in children with autism. **Am J Clin Nutr**, v. 80, p. 1611-1617, 2004.

JAMES, S.J.; ROSE, S.; MELNYK, S. et al. Cellular and mitochondrial glutathione redox imbalance in lymphoblastoid cells derived from children with autism. **FASEB J**, v. 23, n. 8, p. 2374-2383, 2009.

JANEWAY JUNIOR, C.A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M.J. **Imunobiologia : o sistema imune na saúde e na doença**. Porto Alegre: Artmed, 2007. 848p.

JOHNSON, C.P.; MYERS, S.M. Identification and evaluation of children with autism spectrum disorders. **Pediatrics**, v. 120, n. 5, p. 1183-1215, 2007.

JYONOUCHI, H.; GENG, L.; CUSHING-RUBY, A. et al. Impact of innate immunity in a subset of children with autism spectrum disorders: a case control study. **J Neuroinflammation**, v. 5, p. 52, 2008.

JYONOUCHI, H.; SUN, S.; LE, H. Proinflammatory and regulatory cytokine production associated with innate and adaptive immune responses in children with autism spectrum disorders and developmental regression. **J Neuroimmunol**, v. 120, p. 170-179, 2001.

KAN, C.C.; BUITELAAR, J.K.; VAN DER GAAG, R.J. Autism spectrum disorders in adults. **Ned Tijdschr Geneesk**, v. 152, p. 1365-1369, 2008.

KANNER, L. Autistic disturbances of affective contact. **Nerv Child**, v. 2, p. 217-250, 1943.

KLIN, A.; JONES, W.; SCHULTZ, R. et al. Defining and quantifying the social phenotype in autism. **Am J Psychiatry**, v. 159, n. 6, p. 895-908, 2002.

KLIN, A. Autism and Asperger syndrome: an overview. **Rev Bras Psiquiatr**, v. 28 (supl I), p. 3-12, 2006.

LAMB, J.A.; MOORE, J.; BAILEY, A. et al. Autism: recent molecular genetic advances. **Hum Mol Genet**, v. 9, n. 6, p. 861-868, 2000.

LANDS, W.E.; CRAWFORD, C.G. Enzymes of membrane phospholipids metabolism in animals. In: MARTONOSI, A. **The enzymes of biological membranes**. New York; Plenum Press, 1979. v. 2, p. 3-85.

LE COUTER, A.; BAILEY, A.; GOODE, S. et al. A broader phenotype of autism: the clinical spectrum in twins. **J Child Psychol Psychiatry**, v. 37, p. 785-801, 1996.

LEON, V.; BOSA, C.; HUGO, C. et al. Propriedades Psicométricas do Perfil Psicoeducacional Revisado: PEP-R. **Avaliação Psicológica**, v. 3, n. 1, p. 39-52, 2004.

LEONARD, W.J., O'SHEA, J.J. Jaks and STATs: biological implications. **Annu Rev Immunol**, v. 16, p. 293-322, 1998.

LI, X.; CHAUHAN, A.; SHEIKH, A.M. et al. Elevated immune response in the brain of autistic patients. **J Neuroimmunol**, v. 207, p. 111-116, 2009.

LORD, C.; COOK, E.H.; LEVENTHAL, B.L. et al. Autism spectrum disorders. **Neuron**, v. 28, p. 355-363, 2000.

LOTTER, V. Epidemiology of autistic conditions in young children. **Social Psychiatry and Psychiatric Epidemiology**, v.1, n. 3, p. 124-135, 1966.

MAESTRINI, E.; PAUL, A.; MONEO, A.P. et al. Identifying autism susceptibility genes. **Neuron**, v. 28, n. 1, p. 19-24, 2000.

MARTELETO, M. R. F.; MENEZES, C.G.L.; TAMANAHA, A.C. et al. Aplicação do Inventário de Comportamentos Autísticos: a concordância nas observações entre pais e profissionais em dois contextos de intervenção. **Rev Bras Psychiatr**, v.30, n. 3, p. 209-214, 2008.

MEIRI, G.; BICHOVSKY, Y.; BELMAKER, R.H. Omega 3 fatty acid treatment in autism. **J Child Adolesc Psychopharmacol**, v. 19, n. 4, p. 449-451, 2009.

MENDES, C.T. **Modulação da atividade da fosfolipase A₂ em neurônios primários em cultura**. 2004. Dissertação (Mestrado) – USP, São Paulo, 2004.

MERCADANTE, M.; VAN DER GAAG, R. J.; SCHWARTZMAN, J. S. Transtornos invasivos do desenvolvimento não-autísticos: síndrome de Rett, transtorno desintegrativo da infância e transtornos invasivos do desenvolvimento sem outra especificação. **Rev Bras Psychiatr**, v. 28 (supl I), p. 12-20, 2006.

MOLLOY, C.A.; MORROW, A.L.; MEINZEN-DERR, J. et al. Elevated cytokine levels in children with autism spectrum disorder. **J Neuroimmunol**, v. 172, p. 198-205, 2006.

NEVES, M.C.L.; TREMEAU, F.; NICOLATO, R. et al. Prejuízos no reconhecimento de emoções faciais em parentes de primeiro grau de portadores de autismo não são associados com o polimorfismo 5HTTPLR. **Rev Bras Psiquiatr**, v. 33, n. 3, p. 261-267, 2011.

NIKOLOV, R.; JONKER, J.; SCAHILL, L. Autismo: tratamentos psicofarmacológicos e áreas de interesse para desenvolvimentos futuros. **Rev Bras Psiquiatr**, v. 28 (supl I), p. 39-46, 2006.

OLSON, B; RETT, A. Autism and Rett syndrome: behavioral investigations and differential diagnosis. **Develop Med Child Neurology**, v. 9, p. 229-441, 1987.

O'REGAN, M.H.; ALIX, S.; WOODBURY, D.J. Phospholipase A2-evoked destabilization of planar lipid membranes. **Neurosci Lett**, v. 202, n. 3, p. 201-203, 1996.

PANGERL, A.M.; STEUDLE, A.; JARONI, H.W. et al. Increased platelet membrane lysophosphatidylcholine in schizophrenia. **Biol Psychiatry**, v. 30, n. 8, p. 837-840, 1991.

PASTURAL, E.; RITCHIE, S.; LU, Y. et al. Novel plasma phospholipids biomarkers of autism: Mitochondrial dysfunction as a putative causative mechanism. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v. 81, n. 4, p. 253-264, 2009.

PEET, M. New strategies for the treatment of schizophrenia: omega-3 polyunsaturated fatty acids. In: PEET, M; GLEN, I; HORROBIN, D.F. (Eds.). **Phospholipid spectrum disorder in psychiatry**. Carnforth, UK: Marius Press, 1999. p. 189-194.

PEET, M.; LAUGHARNE, J.D.; HORROBIN, D.F. et al. Arachidonic acid: a common link in the biology of schizophrenia? **Arch Gen Psychiatry**, v. 51, n. 8, p. 665-666, 1994.

PEET, M.; MURPHY, B. SHAY, J. HORROBIN, D.F. Depletion of omega-3 fatty acid levels in red blood cell membranes of depressive patients. **Biol Psychiatry**, v. 43, p. 315-319, 1998.

PERSICO, A.M.; BOURGERON, T. Searching for ways out of the autism maze: genetic, epigenetic and environmental clues. **Trends neurosci**, v. 29, n. 7, p. 349-358, 2006.

PETEGREW, J.W. KESSHAVAN, M.S.; MINSSHEW, N.J. ³¹P nuclear magnetic resonance spectroscopy: Neurodevelopment and schizophrenia. **Schizophr Bull**, v. 19, p. 35-53, 1993.

PICKLES, A.; BOLTON, P.; MACDONALD, H. et al. Latent-class analysis of recurrence risks for complex phenotypes with selection and measurement error: a twin and family history study of autism. **Am J Hum Genet**, v. 57, p. 717-726, 1995.

PIVEN, J. The broad autism phenotype: A complementary strategy for molecular genetic studies of autism. **Am Genet. Neuropsychiatr Genet**, v. 105, p. 34-35, 2001.

PLIOPLYS, A.V.; GREAVES, A.; KAZEMI, K. et al. Lymphocyte function in autism and Rett syndrome. **Neuropsychobiology**, n. 29, p. 12-16, 1994.

POLITI, P.; CENA, H.; COMELLI, M. et al. Behavioral effects of omega-3 fatty acid supplementation in young adults with severe autism: an open label study. **Arch Medical Res**, v. 39, n. 7, p. 682-685, 2008.

POLLMÄCHER, T.; HAACK, M; SCHULD, A. et al. Effects of antipsychotic drugs on cytokine networks. **J Psychiatr Res**, v. 34, p. 369-382, 2000.

POMEROY, J.C. Autismo infantil e psicose da infância. In: GARFINKEL, B.D.; CARLSON, G.A.; WELLER, E.B. (Org.). **Transtornos psiquiátricos na infância e adolescência**. Porto Alegre: Artes Médicas, 1992. p. 235-250.

PRIYA, M.D.L.; GEETHA, A. A biochemical study on the level of proteins and their percentage of nitration in the hair of autistic children. **Clinica Chimica Acta**, v. 412, n. 11-12, p. 1036-1042, 2011.

PRING, L.; HERMELI, B.; BUHLER, M. et al. Native savant talent and acquired skill. **Autism**, v.1, p. 199-214, 1997.

RICHARDSON, A.J. Omega-3 fatty acids in ADHD and related neurodevelopmental disorders. **International review of psychiatry Abingdon England**, v. 18, n.2, p. 155-172, 2006.

RICHARDSON, A.J.; CALVIN, C.M.; CLISBY, C. et al. Fatty acid deficiency signs predict the severity of reading and related difficulties in dyslexic children. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v.63, n. 1/2, p. 69-74, 2000.

ROSS, B.M.; HUDSON, C.; ERLIEFT, J. et al. Increased phospholipid breakdown in schizophrenia. Evidence for the involvement of a calcium-independent phospholipase A₂. **Arch Gen Psychiatry**, v.54, n.5, p. 487-494, 1997.

ROSSIGNOL, D.A. Hyperbaric oxygen therapy might improve certain pathophysiological findings in autism. **Medical Hypotheses**, v.68, p. 1208-1227, 2007.

ROTROSEN, J.; WOLKIN, A. Phospholipid and prostaglandin hypotheses of schizophrenia. In: MELTZER, H.Y. (Ed.) **Psychopharmacology: The Third Generation of Progress**. New York: Raven Press. 1987. p. 759-764.

RUTTER, M. Diagnosis and definitions of childhood autism. **J Autism Dev Disord**, v.8, n.2, p. 139-161, 1978.

RUTTER, M. Genetic influences in autism. In: VOLKMAR, F.; PAUL, R., KLIN, A.; COHEN, D. (Eds). **Handbook of autism and pervasive developmental disorders**. 3rd ed. New York: Wiley, 2005. Volume 1, Section III, Chapter 16, p. 425-452.

SACKEIM, H.A. Central issues regarding the mechanism of action of electroconvulsive therapy: directions for future research. **Psychopharm Bull**, v. 30, p. 281-308, 1994.

SCHAEFFER, E. L. **A inibição da atividade da fosfolipase A₂ no hipocampo de ratos prejudica a formação da memória de curta e de longa duração: implicações para a doença de Alzheimer**. 2004. Tese (Doutorado) - USP, São Paulo, 2004.

SCHAEFFER, E.L.; GATTAZ, W.F. Cholinergic and glutamatergic alterations beginning at the early stages of Alzheimer disease: participation of the phospholipase A₂ enzyme. **Psychopharm**, v. 1, p. 1-27, 2008.

SCHAEFFER, E.L.; SILVA, E.R.; NOVAES, B.A. et al. Differential roles of phospholipases A₂ in neuronal death and neurogenesis: implications for Alzheimer disease. **Progress in neuro-psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 34, n. 8, p. 1381-1389, 2010.

SCHOPLER, E.; REICHLER, R.J.; BASHFORD, A. et al. **Psychoeducational Profile Revised (PEP-R)**. Texas: Pro-ed; 1990.

SIEGEL, D.P. The Modified Stalk Mechanism of Lamellar/Inverted Phase Transitions and Its Implications for Membrane. **Fusion Biophys J**, v.76. p. 291-313, 1999.

SINGH, V.K. Plasma increase of interleukin-12 and interferon-gamma Pathological significance in autism. **J Immunol**, v. 66, p. 143-145, 1996.

SINGH, V.K.; FUDENBERG, H.H.; EMERSON, D. et al. Immunodiagnosis and immunotherapy in autistic children. **Ann N Y Acad Sci**, v. 540, p. 602-604, 1988.

SINGH, V.K.; WARREN, R.P.; ODELL, J.D. et al. Antibodies to myelin basic protein in children with autistic behavior. **Brain Behav Immun**, v. 7, p. 97-103, 1993.

SÖGÜT, S.; ZOROGLU, S.S.; OZYURT, H. et al. Changes in nitric oxide levels and antioxidant enzyme activities may have a role in the pathophysiological mechanisms involved in autism. **Clinica Chimica Acta**, v. 331, p. 111-117, 2003.

SMESNY, S.; KINDER, D.; WILLHARDT, I. et al. Increased calcium-independent phospholipase A₂ activity in first but not multipisode chronic schizophrenia. **Biol Psychiatry**, v. 57, p. 399-405, 2005.

SMESNY, S.; MILLEIT, B.; NENADIC, I. et al. Phospholipase A₂ activity is associated with structural brain changes in schizophrenia. **Neuroimage**, v.52, n. 4, p. 1314-1327, 2010.

STEVENS, L.J.; ZENTALL, S.S.; ABATE, M.L. et al. Omega-3 fatty acids in body with behaviour, learning, and health problems. **Physiol Behav**, v. 59, n. 4/5, p. 915-920, 1996.

STEVENS, L.J.; ZENTALL, S.S.; DECK, J.L. et al. Essential fatty acid metabolism in boys with attention-deficit hyperactivity disorder. **Am J Clin Nut**, v. 62, n. 761-768, 1995.

STRYER, L. **Biochemistry**. New York: Freeman, 1988. 625p.

STUBBE, D. **Psiquiatria da infância e adolescência**. Porto Alegre: Artmed, 2008. 305p.

SUN, GY; MacQUARRIE, R.A. Deacylation-reacylation arachidonoyl groups in cerebral phospholipids. **Annu N Y Acad Sci**, v. 559, p. 559-537, 1989.

SUN, G.Y.; XU, J.; JENSEN, M.D. et al. Phospholipase A₂ in the central nervous system: implications for neurodegenerative diseases. **J Lipid Res**, v. 45, p. 205-213, 2004.

SUTCLIFFE, J.S.; NURMI, E.L.; LOMBROSO, P.J. Genetics of childhood disorders: XLVII. Autism, part 6: duplication and inherited susceptibility of chromosoma 15q11-q13 genes in autism. **J Am Acad Child Adolesc Psychiatry**, v. 42, n. 2, p. 253-256, 2003.

SWEETEN, T.L.; POSEY, D.J.; SHANKAR, S. et al. High nitric oxide production in autistic disorder: A possible role for Interferon- γ . **Biol Psychiatry**, v. 55, p. 434-437, 2004.

SZATMARI, P.; JONES, M.B.; ZWAIGENBAUM, L. et al. Genetics of autism: overview and new directions. **J Autism Dev Disord**, v. 28, n. 5, p. 351-368, 1998.

SZATMARI, P.; PATERSON, A.D.; ZWAIGENBAUM, L. et al. Mapping autism risk loci using genetic linkage and chromosomal rearrangements. **Nat Genet**, v. 39, n. 3, p. 319-328, 2007.

TAVARES, H.; YACUBIAN, J. TALIB, L.L.; BARBOSA, N.R.; GATTAZ, W.F. Increased phospholipase A₂ activity in schizophrenia with absent response to niacin. **Schizophr Res**, v. 61, p. 1-6, 2003.

TAYLOR, C.; FRICKER, A.D.; DEVI, L.A.; GOMES, I. Mechanisms of action of antidepressants: from neurotransmitter systems to signaling pathways. **Cell Signal**, v. 17, p. 549-557, 2005.

TOSTES, M.H.F. Transtornos mentais da infância e da adolescência. In: RIBEIRO, M.S. (Org.). **Ferramentas para descomplicar a atenção básica em saúde mental**. Juiz de Fora: Ed. UFJF, 2007. p. 141-174.

TUCHMAN, R.; RAPIN, I. Epilepsy in autism. **Lancet Neurol**, v. 1, n.6, p. 352-358, 2002.

TURNER, M.; BARNBY, G.; BAILEY, A. Genetic clues to the biological basis of autism. **Molecular Medicine Today**, v. 6, p. 238-244, 2000.

UNDIE, A.S.; WEINSTOCK, J.; SARAU, H.M. et al. Evidence for a distinct D1-like dopamine receptor that couples to activation of phosphoinositide metabolism in brain. **J Neurochem**, v. 62, p. 2045-2048, 1994.

VAN, D.M.; DOFFERHOFF, A.S.; VAN DER MEER, J.M. Cytokines and the response to infection. **J Pathol**, v. 168, p. 349-356, 1992.

VEENSTRA-VANDERWEELE, J.; CHRISTIAN, S.I.; COOK, E.H. Autism as a paradigmatic complex genetic disorder. **Annu Rev Genomics Hum Genet**, v. 5, p. 379-405, 2004.

VISIOLI, F.; RODRIGUEZ de TURCO, E.B.; KREISMAN, N.R.; et al. Membrane lipid degradation is related to interictal cortical activity in a series of seizures. **Metab Brain Dis**, v. 9, p. 161-170, 1994.

VOJDANI, A.; MUMPER, E.; GRANPEESHEH, D. et al. Low natural killer cell cytotoxic activity in autism: The role of glutathione, IL-2 and IL-15. **J Neuroimmunol**, v. 205, p. 148-154, 2008.

VOLKMAR, F.R. Autismo e transtornos globais do desenvolvimento. In: LEWIS, M. (Ed.). **Tratado de psiquiatria da infância e da adolescência**. Porto Alegre: Artes Médicas, 1995. p. 513-522.

VOLKMAR, F.R.; COHEN, D.J. Diagnosis of pervasive developmental disorders. In: LAHEY, B; KAZDIN, A (Eds): **Advances in Clinical Child Psychology** . New York: Plenum Press, 1988. v. 11, p.249-284.

VOLKMAR, F.R.; LORD, C.; BAILEY, A. et al. Autism and pervasive developmental disorders. **J Child Psychiatry**, v. 45, n. 1, p. 135-170, 2004.

VOLKMAR, F.R.; STIER, D.M.; COHEN, D.J. Age of recognition of pervasive developmental disorder. **Am J Psychiatry**, v. 142, p. 1450-52, 1985.

WALKER, E.H.; PERISIC, O.; RIED, C. et al. Structural insights into phosphoinositide 3-kinase catalysis and signalling. **Nature**, v. 402, p. 313-320, 1999.

WARREN, R.P.; FOSTER, A.; MARGARETTEN, N.C. et al. Reduced natural killer cell activity in autism. **J Am Acad Child Adolesc Psych**, v. 26, p. 333-335, 1987.

WARREN, R.P.; YONK, J.; BURGER, R.P. et al. DR-positive-T cells in autism: association with decreased plasma levels of the complement C4B protein. **Neuropsychobiology**, v. 31, p. 53-57, 1995.

WEIZMAN, A.; WEIZMAN, R.; SZEKELY, G.A. et al. Abnormal immune response to brain tissue antigen in the syndrome of autism. **Am J Psychiat**, v. 139, p. 1462-1465, 1982.

WERNER, E.; DAWSON, G. Validation of the phenomenon of autistic regression using home videotapes. **Arch Gen Psychiatry**, v. 62, n. 8, p. 889-895, 2005.

WHO. **Classificação de Transtornos mentais e de Comportamento da CID-10: Descrições clínicas e Diretrizes Diagnósticas**. Porto Alegre: Artes Médicas, 1993.

YACUBIAN, J.; CASTRO, C.C; OMETTO, M. et al. ³¹P-spectroscopy of frontal lobe in schizophrenia: alterations in phospholipids and high-energy phosphate metabolism. **Schizophr Res**, v. 58, n.2-3, p. 117-122, 2002.

ZHANG, X.Y.; ZHOU, D.F.; CAO, L.Y. et al. Changes in serum interleukin-2, -6, and -8 levels before and during treatment with risperidone and haloperidol: relationship to outcome in schizophrenia. **J Clin Psychiatry**, v. 65, p. 940-947, 2004.

ZILBOVICIUS, M.; MERESSE, I.; BODDAERT, N. Autismo: neuroimagem. **Rev Bras Psiquiatr**, v. 28 (supl I), p. 21-28, 2006.

ZOROGLU, S.S.; YÜREKLI, M.; MERAM, I. et al. Pathophysiological role of nitric oxide and adrenomedullin in autism. **Cell Biochem Funct**, v. 21, p. 55-60, 2003.

ZIMMERMAN, A.W.; JYONOUCHI, H.; COMI, A.M. et al. Cerebrospinal Fluid and Serum Markers of Inflammation in Autism. **Pediatr Neurol**, v.33, n. 3, p. 195-201, 2005.

APÊNDICE A – Produção científica relacionada ao trabalho

TOSTES, M.H.F.S.; TEIXEIRA, H.C.; GATTAZ, W.F.; RAPOSO, N.R.B. Níveis alterados de neurotrofina, neuropeptídeo, citocinas e óxido nítrico no autismo. In: 34º CONGRESSO BRASILEIRO DE PEDIATRIA, 2009, Brasília. CD- **Anais do 34º Congresso Brasileiro de Psiquiatria**, 2009.

TOSTES, M.H.F.S.; TEIXEIRA, H.C.; GATTAZ, W.F.; RAPOSO, N.R.B. Immune dysregulation and altered lipid metabolism in autism. In: 15th WORLD CONGRESS OF PSYCHIATRY, Buenos Aires, Argentina, 2011. CD- Abstracts- **15th World Congress of Psychiatry**, 2011.

TOSTES, M.H.F.S.; TEIXEIRA, H.C.; GATTAZ, W.F.; BRANDÃO, M.A.F.; RAPOSO, N.R.B. Altered neurotrphin, neuropeptide, cytokines and nitric oxid levels in autism. *Pharmacopsychiatric*, v.45, 1-3, 2012.

ANEXO A – Parecer nº 140/2007



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PRO-REITORIA DE PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP-UFJF
36036900- JUIZ DE FORA - MG - BRASIL

Parecer nº 140/2007

Protocolo CEP-UFJF: «1065.111.2007» **FR:** «128681» **CAAE:** «0076.0.180.000-07»

Projeto de Pesquisa: "Autismo infantil: aspectos neurobiológicos"

Versão do Protocolo e Data: «02/08/07»

Área Temática: «Grupo III»

Pesquisador Responsável: Nádia Rezende Barbosa

TCLE: «02/08/07»

Pesquisadores Participantes: Márcia Helena Fávero de Souza Tostes, Eder Schmidt

Instituição: Faculdade de Farmácia e Bioquímica/DAT/NIQUA -UFJF

Sumário/comentários do protocolo:

- O estudo se justifica científica e socialmente, uma vez que, dentre outras justificativas, merece destaque o fato de o autismo ser um transtorno do neurodesenvolvimento que acarreta sofrimento tanto para o indivíduo que o possui quanto para aqueles direta e indiretamente envolvidos com a pessoa (P.ex. família). Apesar da vasta literatura sobre o transtorno, ainda há várias lacunas no conhecimento científico sobre o autismo.
 - A revisão de literatura apresentada é suficiente para fundamentar o problema estudado. As referências e citações são apresentadas paradigmaticamente.
 - O objetivo geral do estudo é "avaliar a correlação entre resposta imunológica, o perfil de fosfolípidios de membrana e o déficit cognitivo em crianças autistas".
 - Trata-se de um estudo quantitativo tipo caso-controle, que "incluirá 30 crianças autistas e 30 crianças normais na mesma faixa etária". "As crianças com diagnóstico de autismo serão encaminhadas pelo Centro de Atenção Psicossocial Infanto-Juvenil (Departamento de Saúde Mental- SSSDA de Juiz de Fora) e pela Fundação de Apoio ao Indivíduo com Necessidades Especiais (FIAINE). As crianças do grupo controle serão selecionadas entre aquelas atendidas por esses serviços, mas que não apresentam transtornos mentais".
 - Para coleta dos dados, "os pacientes e controles serão submetidos a entrevistas clínicas, exame do estado mental e aplicação de testes psicométricos para avaliação da capacidade intelectual". As crianças autistas "serão avaliadas através da aplicação da escala de Rimbeland". Ambos os grupos terão coletadas amostras de sangue venoso que serão submetidas a exames laboratoriais para determinação de óxido nítrico etc.
 - Além da Faculdade de Farmácia e Bioquímica da UFJF, participarão do estudo o Departamento de Saúde Mental- SSSDA de Juiz de Fora e a Fundação de Apoio ao Indivíduo com Necessidades Especiais (FIAINE).
 - O orçamento detalhado e o responsável pelo financiamento da pesquisa foram apresentados adequadamente.
 - O cronograma apresenta as atividades de pesquisa ao longo de dez meses de 2007, sendo que a coleta de dados está prevista para agosto e o encerramento para dezembro do referido ano.
 - Os riscos e desconfortos (mínimos) e os possíveis e benefícios esperados foram descritos no protocolo de pesquisa.
 - O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE faz uma descrição suficiente dos procedimentos, explicitando riscos e desconfortos esperados, indicando ressarcimento de despesas, indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa e informar o sujeito da pesquisa sobre como fazer contatos com o pesquisador, está em linguagem adequada, clara para compreensão do sujeito, informando que está de acordo com a Res. 196/96 CNS.
 - Os pesquisadores possuem qualificação suficiente para a realização do estudo.
- Salientamos que o pesquisador deverá encaminhar a este comitê o relatório final da pesquisa.
- Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/UFJF, de acordo com as atribuições definidas na Res. CNS 196/96, manifesta-se pela **aprovação** do protocolo de pesquisa proposto.

Situação: Projeto Aprovado
Juiz de Fora, 02 de agosto de 2007

Prof. Dra. 
Coordenadora – CEP/UFJF

RECEBI
DATA: ____ / ____ / 2007
ASS: _____

ANEXO B – Termo de consentimento livre e esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA – **Autismo infantil: aspectos neurobiológicos**

PESQUISADORES: Dr^a Nádia Rezende Barbosa*, Márcia Helena Fávero de Souza Tostes, Eder Schmidt* e Ronald Kleinsorge Roland*, Rosemeri Chaves de Souza Mendes**.

CARGO/FUNÇÃO: *professores da UFJF e médica, ** Neuropsicóloga da FIAINE

UNIDADES DA UFJF: Faculdade de Farmácia e Bioquímica /UFJF e Faculdade de Medicina/Hospital Universitário/UFJF.

Sem risco	<input type="checkbox"/>	Risco mínimo	<input type="checkbox"/>	Risco médio	<input checked="" type="checkbox"/>
Risco baixo	<input type="checkbox"/>	Risco maior	<input type="checkbox"/>		

(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)

É possível, mas não garantido, que os pacientes, portadores de autismo, possam, no futuro, se beneficiar dos resultados desse estudo; seus familiares também poderão se beneficiar. O nosso estudo visa um maior conhecimento dos mecanismos bioquímicos responsáveis pelo aparecimento desta doença. De posse desses conhecimentos, espera-se conseguir no futuro melhores estratégias para a prevenção, diagnóstico e tratamento desta doença.

Acredita-se que crianças autistas tenham alterações na resposta imunológica (como deficiência imunológica), no metabolismo de fosfolípidios e na capacidade cognitiva (capacidade de obter, organizar e utilizar o conhecimento intelectual) e que existe correlação entre essas alterações. Até o momento não são conhecidos os mecanismos pelos quais isto possa ser desencadeado e se essas alterações, de fato, possuem correlações entre si. Uma vez conhecidas as bases bioquímicas dessa patologia, poderão ser evitados alguns riscos e efeitos colaterais dos medicamentos utilizados, e, provavelmente, a descoberta de medicamentos mais eficazes.

Se você concordar com a participação, deverá ser preenchida uma ficha de avaliação clínica psiquiátrica. As crianças com critérios diagnósticos que caracterizam os Transtornos Globais do desenvolvimento (Transtornos do espectro do Autismo) e para as quais não foi realizada a Ressonância Magnética do Encéfalo, serão submetidas a esse exame, após utilização de um agente anestésico inalatório denominado Halotano (2-bromo-2-cloro-1,1,1-trifluoretano), administrado com mistura gasosa carreadora (rica em Oxigênio), na dose de 20 ml por hora, apenas pelo tempo necessário para a realização do exame. Caso descartada a ocorrência de qualquer doença neurológica que possa estar relacionada aos sintomas, em seguida serão realizados os testes psicométricos (testes para a avaliação da capacidade cognitiva) e será feita uma coleta de 10 ml (equivalente a uma colher de sopa) de sangue da veia do paciente ou controle sob sua responsabilidade, como para qualquer exame. As amostras serão utilizadas para dosagens de óxido nítrico, a dosagem de interferon-gama, TNF-alfa, interleucina-12 e dos fosfolípidos. Todo o material será codificado de modo que a identidade dos participantes não seja revelada.

Os desconfortos e riscos esperados são mínimos em relação ao processo de coleta de sangue. O paciente poderá apresentar dor, desconforto ou hematoma quando o sangue for retirado.

Para a realização do exame de Ressonância o risco é considerado médio, pela redução da pressão arterial dose-dependente, embora o grau de profundidade da anestesia possa ser modificado com facilidade, com rápida recuperação da consciência

Luciana
 P/ Prof. Dra. Luciana Andrea Sakano
 COORDENADORA CEP-UFJF

quando a administração é cessada, com uma incidência relativamente baixa de efeitos colaterais.

Você pode perguntar sobre qualquer dúvida que tenha agora ou a qualquer momento durante o estudo e poderá ter acesso às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa.

Você pode retirar o consentimento e interromper a participação do paciente pelo qual você é responsável a qualquer momento, sem que haja qualquer punição ou perda de benefícios aos quais vocês tenham direito, nem mesmo com relação a seu atendimento pelo Programa de Saúde Mental, seja agora ou em qualquer situação futura em que dele você venha necessitar.

Os registros que identificarem o paciente pelo seu nome serão mantidos confidenciais e nenhum documento que o identifique sairá do laboratório. Se os resultados desse estudo forem publicados, sua identidade permanecerá absolutamente confidencial.

Garantimos a disponibilidade de assistência no HU para atender a qualquer eventualidade relacionada à coleta de sangue diretamente decorrente dessa pesquisa e a disponibilidade da assistência do médico anestesista na clínica Ultrimagem, onde será realizada a Ressonância Magnética do Encéfalo.

Nomes, endereço e telefone dos responsáveis pelo acompanhamento da pesquisa para contato em caso de dúvidas

Dr^a Nádia Rezende Barbosa – (32) 3234-1127 — Faculdade de Farmácia e Bioquímica da UFJF - Rua Dom Silvério, 394 - Juiz de Fora – MG
Ou (32) 3229-3809 - FFB – Campus Universitário – Bairro Martelos - Juiz de Fora – MG.

CONSENTIMENTO PÓS ESCLARECIDO

Uma vez que entendi o que foi explicado, a partir da leitura e outras informações, declaro ter sido adequadamente esclarecido a respeito do projeto de pesquisa para o qual consinto na participação, como voluntário, de, sob minha responsabilidade.

Assinatura do responsável

1- NOME DO RESPONSÁVEL: _____
DOCUMENTO DE IDENTIDADE N°: _____ SEXO: () M () F
DATA DE NASCIMENTO: _____
ENDEREÇO: _____
BAIRRO: _____ CIDADE: _____
CEP: _____ TELEFONE: DDD (____) _____

Juiz de Fora, ____ de _____ de 200__.


Prof.^a Dra. Luciana Andrea Salvo
COORDENADORA CEP-UFJF

ANEXO C – Laudo- Ressonância magnética do encéfalo

Axial Centro de Imagem - Unidade Bernardo Monteiro



RESSONÂNCIA
MAGNÉTICA

TOMOGRAFIA
COMPUTADORIZADA

MAMOGRAFIA

DENSITOMETRIA
ÓSSEA

ECODOPPLERCARDIOGRAFIA

COLOR
DOPPLER

ULTRA-SONOGRAFIA

RADIOLOGIA

BIÓPSIA

Nome:
Dr(a):

Reg.:
Data:

RESSONÂNCIA MAGNÉTICA DO ENCÉFALO

Técnica de exame:

- * FAST-SPIN-ECHO - Cortes axiais e coronais ponderados em T2.
- * FAST-INVERSION-RECOVERY - Cortes axiais ponderados em T2, com supressão líquórica (FLAIR).
- * GRADIENT-ECHO - Cortes axiais ponderados em T2*.
- * SPIN-ECHO - Cortes sagitais e axiais ponderados em T1.

Aspectos observados:

- Tronco cerebral e parênquima cerebelar com configuração e características de sinal normais.
- Cisternas basais e comunicantes livres.
- Sistema ventricular com forma, volume e posição anatômicas.
- Parênquima cerebral com configuração, distribuição e características de sinal normais para as substâncias branca e cinzenta.
- Sulcos da superfície cortical anatômicos.
- Ausência de coleção extra-axial.
- Aspecto anatômico da transição crânio-vertebral.
- Cavidade paranasais visualizadas sem anormalidades.

Conclusão:

- Encéfalo de aspecto normal à Ressonância Magnética.

Documentado em 06 filmes.

Central de Atendimento:
(31) 3273.1212
Serviço de Atendimento ao Cliente:
0800 301212
Av. Bernardo Monteiro, 1472
30150-280 Funcionários BH
Rua Gonçalves Dias, 2867
30140-093 Santo Agostinho BH
cidbh@cidbh.com.br

Dr(a) JOSE CARLOS TADEU MARTINS
CRMMG20831/MG

PEP – R 1

Comportamento

Desenvolvimento

Bolhas

1. Desenrosca a tampa
2. Assopra as bolinhas de sabão
3. Acompanha visualmente o movimento
4. Busca visualmente na Extensão da Linha média

R	M	S	L

I	P	MF	MG	OM	DC	CV

Blocos táteis

5. Examina os Blocos Táteis (A/M/G)

--	--	--	--

--	--	--	--	--	--	--

Caleidoscópio

6. Manipula o Caleidoscópio
7. Apresenta Dominância Ocular

Campainha

8. Toca Duas Vezes

--	--	--	--

--	--	--	--	--	--	--

Argila e Pinos

9. Cutuca com os Dedos
10. Agarra os Pinos
11. Enrola Argila
12. Modela Argila em Forma de Tigela

Marionetes de Cachorro, Gato e Objetos (colher, xícara, escova de dentes, tecido)

13. Manipula o Marionete
14. Imita os Sons de Animais
15. Imita ações com Objetos (3)
16. Aponta para Partes do Corpo dos Marionetes (olho, nariz, boca, orelha) (3)
17. Aponta para as Próprias Partes do Corpo (3)
18. Interação Completa Brincando (estorna) (R se 13 = R)

A
M
G

0	0	1	0

P
E
R

6	3	5	0	0	3	0

PEP – R 2

Comportamento Desenvolvimento

Quadro de Formas Geométricas

19. Indica os Locais Corretos (3)

20. Encaixa as Formas no Local (3)

21. Identifica as Formas Expressivamente (3)

22. Identifica as Formas Receptivamente (3)

R	M	S	L

I	P	MF	MG	OM	DC	CV

Quadro de Objetos

(guarda chuva, pintinho, borboleta, pêra)

23. Completa o Quadro de Objetos

24. Olha para Pegar as Peças

Quadro de Formas por Tamanho

25. Indica os Locais pelo Tamanho

26. Coloca as Peças nos Locais pelo Tamanho

27. Identifica Grande e Pequeno Expressivamente

28. Identifica Grande e Pequeno Receptivamente

Montagem de um Quebra Cabeça Encaixável (Gato)

29. Indica a Posição das Peças (R se 23 = R)

30. Encaixa as Peças do Quebra Cabeça (R se 23 = R)

Quebra Cabeça (Vaca)

31. Completa o Quebra Cabeça (R se 23 = R)

--	--	--	--

--	--	--	--	--	--	--

Discos e Blocos Coloridos

32. Parea Blocos com Discos (5)

33. Nomeia as Cores Expressivamente (5)

34. Nomeia as Cores Receptivamente (5)

Castanhola ou Clapper

35. Ouve e se Orienta ao Som da Castanhola

36. Reage ao Som da Castanhola (A/M/G)

#	0	0	1	0
A				
M				
G				

#	0	5	0	1	3	5	3
P							
E							
R							

PEP – R 3

Comportamento

Desenvolvimento

Atividade Física

37. Anda Sozinho

38. Bate Palmas

39. Fica sobre um Pé Só (R se 37 = R)

40. Pula para Frente e para Trás com os Dois Pés

41. Imita Movimentos Motores Grossos (levantar o braço, tocar o nariz, tocar o nariz e levantar outro braço)

42. Tocar os dedos do Polegar ao mínimo em seqüência.

R	M	S	L

I	P	MF	MG	OM	DC	CV

Bola

43. Pega a Bola (1 em 3 tentativas)

44. Joga a Bola (1 em 3 tentativas)

45. Chuta a Bola (1 em 3 tentativas)

46. Apresenta Dominância de MI (pé)

47. Carrega a Bola (4 passos) (R se 37 = R)

48. Empurra a Bola (P se 44 = P)

Escadas

49. Sobe Escadas Usando Alternadamente os Pés

--	--	--	--

--	--	--	--	--	--	--

Cadeira

50. Sobe na Cadeira

--	--	--	--

--	--	--	--	--	--	--

Plataforma de Rodas

51. Se Empurra Sobre a Plataforma

--	--	--	--

--	--	--	--	--	--	--

Toalha ou Xícara ou Brinquedo Preferido

52. Jogo Social de Bebê ou Criança (P se 18 = P)

53. Encontrar Objeto Escondido (P se 108 = P)

Espelho

54. Reage a Própria Imagem no Espelho (A/M/G)

--	--	--	--

--	--	--	--	--	--	--

Contato Físico

55. Reage a Contato Físico (A/M/G)

--	--	--	--

--	--	--	--	--	--	--

#	2	0	0	0
A				
M				
G				

#	2	0	1	13	0	1	0
P							
E							
R							

PEP – R 4

Comportamento

Desenvolvimento

Cócegas

56. Reage a Cócegas (A/M/G)

R	M	S	L

I	P	MF	MG	OM	DC	CV

Apito

57. Houve e Reage ao Som do Apito

58. Reage ao Som do Apito (A/M/G)

Reage a Gestos

59. Reage a Gestos

--	--	--	--

--	--	--	--	--	--	--	--

Copo e Suco

60. Toma o Suco no Copo

--	--	--	--

--	--	--	--	--	--	--	--

Pote e Objeto Preferido

61. Gestos Pedindo Ajuda

--	--	--	--

--	--	--	--	--	--	--	--

Contas, Barbante Grosso e Eixo

62. Reage ao Barbante (A/M/G)

--	--	--	--

63. Enfia as Contas no Barbante (1)

--	--	--	--

64. Balança as Contas no Barbante

--	--	--	--

65. Tira as Contas no Eixo (6)

--	--	--	--

66. Coloca as Contas no Eixo (P se 62 = P)

--	--	--	--

67. Usa as Mãos Cooperativamente

--	--	--	--

68. Transfere os Objetos de uma Mão para Outra

--	--	--	--

Identificação

69. Qual é seu nome?

--	--	--	--

--	--	--	--	--	--	--	--

70. Você é um Menino ou uma Menina?

--	--	--	--

Livro de Escrita

71. Escreve Espontaneamente

--	--	--	--

--	--	--	--	--	--	--	--

72. Apresenta Dominância Manual

--	--	--	--

#	A	M	G

#	P	E	R

PEP – R 5

Comportamento

Desenvolvimento

Livro de Escrita (cont.)

73. Cópia Linha Vertical (1 em 3 tentativas) (R se 71 = R)

74. Cópia Circulo (1 em 3 tentativas) (R se 71 = R)

75. Cópia Quadrado (1 em 3 tentativas) (R se 73 = R)

76. Cópia Triangulo (1 em 3 tentativas) (R se 73 = R)

77. Copai Lozango (1 em 3 tentativas) (R se 73 = R)

78. Colore em Linhas (1 em 3 tentativas) (R se 71 = R)

79. Traça Formas (P se 74 – 77 = P ou E)

R	M	S	L

I	P	MF	MG	OM	DC	CV

Loto Alfabético

80. Pareia Letras (9)

81. Identifica Letras Expressivamente (9)

82. Identifica Letras Receptivamente (9)

83. Cópia Letras (7) (R se 73 = R)

84. Desenha uma Pessoa (R se 73 = R)

85. Escreve o Primeiro Nome (R se 83 = R)

Papel e Tesoura

86. Corta Papel com Tesoura

--	--	--	--

--	--	--	--	--	--	--

Saco com 5 Objetos

87. Identifica e Entrega 5 Objetos (4)
(pode precisar de dicas visuais)

88. Identifica Objetos pelo Tato (4) (sem dica visual)

Quadro e Peças de Feltro

89. Faz um Menino das Peças de Feltro

--	--	--	--

--	--	--	--	--	--	--

Brincar Não Estruturado

90. Brinca Sozinho (A/M/G)

91. Iniciativa de Interação Social (A/M/G)

92. Reage à Voz do Avaliador (A/M/G)

#	2	1	0	0
A				
M				
G				

#	0	0	3	0	9	4	1
P							
E							
R							

PEP – R 6

Comportamento

Desenvolvimento

Pequenos Blocos e Caixas

93. Empilha Blocos

94. Coloca os Blocos na Caixa

95. Conta de 2 a 7 Blocos

96. Receptivamente Conta 2 a 7 Blocos

R	M	S	L

I	P	MF	MG	OM	DC	CV

Copos e Blocos

97. Atende a Duas instruções Sequenciadas

--	--	--	--

--	--	--	--	--	--	--

Blocos, Tabuleiros e Containers

98. Seleção com 2 Opções (R se 94 = R)

99. Coloca em Cesta (P se 98 = P ou L)

Imitação de Dígitos

100. Repete 2 e 3 Dígitos

101. Repete 2 e 3 Dígitos 1° Tentativa 7-9; 2-4-1
2° Tentativa 5-3; 5-7-9

102. Repete 4 e 5 Dígitos (R se 100 = R)

103. Repete 4 e 5 Dígitos 1° Tentativa 5-8-6-1; 3-2-9-4-8

Contagem Direta

104. Conta Alto (1 a 10)

--	--	--	--

--	--	--	--	--	--	--

Cartões Numéricos

105. Identifica Números Expressivamente (10)

--	--	--	--

--	--	--	--	--	--	--

Adir e Subtrair

106. Soluciona Problemas na 2° Pessoa (R se 95 = R)

107. Soluciona Problemas na 3° Pessoa (R se 95 = R)

#	0	0	0	0
A				
M				
G				

#	2	0	1	0	2	3	7
P							
E							
R							

PEP – R 7

	Comportamento				Desenvolvimento						
	R	M	S	L	I	P	MF	MG	OM	DC	CV
3 Xícaras e Bala											
108. Encontra Bala sob Xícara (2) (R se 53 = R ou E)											
109. Consegue Pegar “Pinçando”											
Cartões Funcionais											
110. Simula o Uso de Objetos (sons e gestos) (5)											
Cartões Funcionais											
111. Houve e se Orienta ao Som do Sino											
112. Reage ao Som do Sino (A/M/G)											
Sino, Castanhola e Colher											
113. Imita com Estes Objetos (3)											
Cartões de Calssificação											
114. Seleciona os Cartões por Cor e Forma (12) (R se 32 = R ou E)											
Pareamento de Cartões com Objetos											
115. Pareia Objetos com Figuras (5)											
116. Nomeia Objetos (5)											
117. Pega e Entrega Objetos quando Solicitado (3)											
118. Demonstra as Funções dos Objetos (4)											
Interruptor de Luz											
119. Aciona o Interruptor de Luz											
Livro de Linguagem											
120. Demonstra Interesse pelo Livro											
121. Identifica Figuras Receptivamente (14)											
122. Identifica Figuras Expressivamente (14)											
Repete Sons, Palavras e Frases											
123. Repete Sons (3) (mmm, ba-ba, pa-ta, la-la)											
124. Repete Palavras (2) (dentro, bolacha, bebê)											

#	0	0	1	0
A				
M				
G				

#	3	0	0	0	0	4	11
P							
E							
R							

PEP – R 8

Comportamento

Desenvolvimento

Repete Sons, Palavras e Sentenças

125. Repete Frases e sentenças Curtas (2) (R se 124 = R)

126. Repete Sentenças Simples (2) (R se 125 = R ou E)

127. Repete Sentenças Complexas (2) (R se 126 = R ou E)

Caixa, Marionete, Copo, Cadeira, Bola

128. Responde as Solicitações Verbais

Imitação

129. Reage a Imitação de suas Próprias Ações (P se 41 = P)

130. Reage a Imitação de seus Próprios Sons (P se 124 = P)

Comandos

131. Responde a Comandos Simples (3)

Interruptor de Luz

132. Usa Frases de 2 Palavras (3)

133. Usa Frases de 5 Palavras (1)

134. Usa Plurais (2)

135. Usa Pronomes (1)

Livro de Linguagem

136. Lê Palavras Curtas (3)

137. Lê Sentenças Curtas (1) (R se 136 = R ou E)

138. Lê com Poucos Erros (R se 137 = R ou E)

139. Lê com Compreensão (2) (R se 137 = R ou E)

140. Lê e Acompanha Instruções (R se 137 = R ou E)

Caixa se “Pronto” (trabalho concluído)

141. Antecipa Rotinas

“Tchau!”

142. Se Despede fazendo “Tchau” com a Mão (P se 41 = P)

Beliscão

143. Reação ao Beliscão (A/M/G)

R	M	S	L

I	P	MF	MG	OM	DC	CV

--	--	--	--

--	--	--	--	--	--	--

--	--	--	--

--	--	--	--	--	--	--

--	--	--	--

--	--	--	--	--	--	--

--	--	--	--

--	--	--	--	--	--	--

--	--	--	--

--	--	--	--	--	--	--

#	0	0	1	0
A				
M				
G				

#	3	0	0	0	0	4	11
P							
E							
R							

PEP – R 9

Comportamento

Observações Comportamentais

144. Exploração do Ambiente do Teste

145. Exploração dos Materiais do Teste

146. Contato Ocular

147. Sensibilidade Visual

148. Sensibilidade Auditiva

149. Interesse por Texturas

150. Interesse por Gostos

151. Interesse por Cheiros

152. Afeto

153. Comportamento Durante as Atividades

154. Busca Ajuda do Avaliador

155. Reação de Medo

156. Movimentos e Maneirismos

157. Consciência da Presença do Avaliador

158. Cooperação com o Avaliador

159. Amplitude da Atenção

160. Tolerância a Interrupções

161. Entonação e Inflexão

162. Balbucio

	R	M	S	L
144. Exploração do Ambiente do Teste				
145. Exploração dos Materiais do Teste				
146. Contato Ocular				
147. Sensibilidade Visual				
148. Sensibilidade Auditiva				
149. Interesse por Texturas				
150. Interesse por Gostos				
151. Interesse por Cheiros				
152. Afeto				
153. Comportamento Durante as Atividades				
154. Busca Ajuda do Avaliador				
155. Reação de Medo				
156. Movimentos e Maneirismos				
157. Consciência da Presença do Avaliador				
158. Cooperação com o Avaliador				
159. Amplitude da Atenção				
160. Tolerância a Interrupções				
161. Entonação e Inflexão				
162. Balbucio				

#	7	4	6	2
A				
M				
G				

PEP – R 10

Comportamento

Observações Comportamentais (continuação)

	R	M	S	L
163. Uso de Palavras				
164. Uso de Jargões e Linguagem Idiosincrática				
165. Ecolalia Tardia				
166. Ecolalia Imediata				
167. Perseverança de Palavras ou Som				
168. Uso de Pronomes				
169. Inteligibilidade da Fala				
170. Habilidade Sintática				
171. Comunicação Espontânea				
172. Motivação por Recompensas				
173. Motivação por Elogio Social				
174. Motivação por Recompensas Intrínsecas				

#	1	2	0	9
A				
M				
G				

Imitação										Total
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	

P
E
R

Percepção										Total
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	

P
E
R

Motora Fina										Total
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	

P
E
R

Motora Grossa										Total
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	

P
E
R

Integração Olho-Mão										Total
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	

P
E
R

Desempenho Cognitivo										Total
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	

P
E
R

Desempenho Cognitivo Verbal										Total
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	

P
E
R

ANEXO E – Tabela- Pontuação total de desenvolvimento

Tabela - Pontuação total de Desenvolvimento de acordo com as faixas etárias (SCHOPLER et al., 1990):

Número de “Ps”	Idade (meses)						
0	0-3	33	16-19	66	24-29	99	43-46
1	0-3	34	16-19	67	25-29	100	43-47
2	1-3	35	16-20	68	25-30	101	44-48
3	1-4	36	16-20	69	25-30	102	44-48
4	2-4	37	16-21	70	26-30	103	45-49
5	3-5	38	16-21	71	26-31	104	45-50
6	4-6	39	17-21	72	27-31	105	46-50
7	5-7	40	17-21	73	27-32	106	46-51
8	6-8	41	18-21	74	28-32	107	47-51
9	7-9	42	18-21	75	29-33	108	47-52
10	8-10	43	18-22	76	29-34	109	48-53
11	9-11	44	18-22	77	30-34	110	49-54
12	9-12	45	18-22	78	30-35	111	50-54
13	10-12	46	19-22	79	30-35	112	51-55
14	10-13	47	19-22	80	31-35	113	52-56
15	11-13	48	19-23	81	31-36	114	52-57
16	11-14	49	19-23	82	32-36	115	53-58
17	12-14	50	19-24	83	32-37	116	54-59
18	12-15	51	19-24	84	33-37	117	54-60
19	12-15	52	20-24	85	34-37	118	55-60
20	12-16	53	20-24	86	34-38	119	56-61
21	13-16	54	20-25	87	35-38	120	57-62
22	13-16	55	20-25	88	35-39	121	58-63
23	14-16	56	21-25	89	36-40	122	59-65
24	14-16	57	21-25	90	36-41	123	61-66
25	14-17	58	21-26	91	37-42	124	63-68
26	14-17	59	21-26	92	37-42	125	65-70
27	15-17	60	22-26	93	38-43	126	67-72
28	15-17	61	22-26	94	39-42	127	68-73
29	15-18	62	23-27	95	40-43	128	70-74
30	15-18	63	23-27	96	41-44	129	71-75
31	15-19	64	23-28	97	41-45	130	73-78
32	15-19	65	24-28	68	42-46	131	74-80