

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO
ADOLESCENTE

**USO DO PEPTÍDEO LIBERADOR DE GASTRINA EM
CRIANÇAS COM DIAGNÓSTICO DE AUTISMO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

JOSEMAR MARCHEZAN

Porto Alegre, Brasil

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO
ADOLESCENTE

**USO DO PEPTÍDEO LIBERADOR DE GASTRINA EM
CRIANÇAS COM DIAGNÓSTICO DE AUTISMO**

JOSEMAR MARCHEZAN

A apresentação desta Dissertação é exigência do Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Rudimar dos Santos Riesgo

Coorientador: Prof. Dr. Gilberto Schwartzmann

Porto Alegre, Brasil

2015

CIP - Catalogação na Publicação

Marchezan, Josemar

Uso do Peptídeo Liberador de Gastrina em crianças com diagnóstico de autismo. / Josemar Marchezan. -- 2015.

117 f.

Orientador: Rudimar dos Santos Riesgo.

Coorientador: Gilberto Schwartzmann.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, Porto Alegre, BR-RS, 2015.

1. Autismo. 2. Peptídeo Liberador de Gastrina. 3. Neuropeptídeos. 4. Transtorno do Espectro Autista. 5. Peptídeos bombesina. I. Riesgo, Rudimar dos Santos, orient. II. Schwartzmann, Gilberto, coorient. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE

ESTA DISSERTAÇÃO FOI DEFENDIDA PUBLICAMENTE EM:

24/11/2015

E, FOI AVALIADA PELA BANCA EXAMINADORA COMPOSTA POR:

Prof. Dr. Cleber Ribeiro Álvares Da Silva

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Dra. Josiane Ranzan

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Prof^a Dr. Paulo Roberto Antonacci Carvalho

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Rudimar dos Santos Riesgo, que com seu entusiasmo pelos estudos acadêmicos me incentivou a iniciar essa caminhada, por seus ensinamentos, orientações e cordialidade. Agradeço a oportunidade e a confiança.

Ao meu co-orientador Prof. Gilberto Schwartsmann, por sua imensa generosidade, não tenho como descrever a gratidão pelas palavras, apoio e cuidado.

À Dra. Michele Michelin Becker, sem a qual esse projeto não teria existido, agradeço a amizade, o incentivo e o apoio constante.

Às minhas preceptoras Dra. Lygia Ohlweiler, Dra. Maria Isabel Bragatti Winckler e Dra. Josiane Ranzan, por me guiarem durante minha formação de Neuropediatra e me apoiarem em todos os momentos de necessidade, ensinando com ética e cordialidade.

As colegas Marcela Matos Monteiro Gonçalves, Manuela Graef da Rosa e Rafaela Vasconcelos Viana, pela amizade, companheirismo e generosidade com que sempre pude contar.

Aos meus pais Ademar e Salete, cujo esforço me permitiu chegar até aqui, e que me mostraram a importância do estudo, do trabalho e da dedicação.

A minha irmã Gabrielle, pelo crescimento conjunto e apoio incondicional.

A minha namorada Luiza, pelo amor, carinho e generosidade, me apoiando e sendo minha força mesmo nas horas mais difíceis.

Às famílias que participaram do estudo, com as quais pude aprender e compartilhar um pequeno momento de sua dura jornada. Agradeço o espírito altruísta na busca de um futuro melhor para as crianças com autismo.

Ao Programa de Pós Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, professores e funcionários, pelos ensinamentos e oportunidades.

Às equipes da Zona 4 do ambulatório do HCPA e do CPC-HCPA pela importante ajuda na realização desse projeto.

Ao Fundo de Investimento em Pesquisas e Eventos (FIPE-HCPA), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação *South American Office for Anticancer Drug Development* pelo suporte financeiro a este estudo.

RESUMO

Introdução: Os neuropeptídeos regulam uma variedade de aspectos da função nervosa e neuroendócrina, atuando através da ativação de receptores específicos da membrana celular. No sistema nervoso central (SNC) os receptores do peptídeo liberador de gastrina (GRPR) são amplamente expressos, e numerosos efeitos centrais têm sido descritos com a sua ativação, incluindo efeitos sobre a saciedade, regulação do ritmo circadiano, termorregulação, modulação do stress, resposta ao medo, ansiedade e memória. Pesquisas mostram que o bloqueio farmacológico do GRPR em modelos animais leva ao aparecimento de déficits na interação social, padrões restritivos de comportamento e estereotípias motoras, sintomas semelhantes ao comportamento autista em humanos, sugerindo a possibilidade de que o complexo GRP/GRPR possa ter um papel na patogênese do transtorno do espectro autista (TEA). Recentemente, dois estudos não controlados com administração do peptídeo liberador de gastrina (GRP) a 13 crianças com autismo sugeriram que ele é seguro e que possa melhorar alguns sintomas do transtorno, principalmente interação social e sintomas associados à irritabilidade. **Objetivos:** Comparar a eficácia, segurança, tolerabilidade do GRP em relação ao placebo em sintomas do TEA. **Metodologia:** Ensaio clínico *crossover*, randomizado, duplo-cego, controlado por placebo, com uso de GRP 160 picomol/kg por 4 dias consecutivos, em 10 crianças com autismo. Os desfechos foram medidos através da escala *Aberrant Behavior Checklist* (ABC). **Resultados:** Todos os participantes eram do sexo masculino, com idade entre 4 e 9 anos. Houve uma redução nos escores da escala ABC e suas subescalas após o uso de GRP e de placebo. Apesar dessa redução ser mais proeminente com o GRP, principalmente nas subescalas Irritabilidade, Comportamento estereotipado e Hiperatividade, não houve diferença estatística entre os resultados ($p = 0,334$). Após uma semana da infusão, 5 crianças apresentavam melhora maior que 25% no escore total da escala ABC com uso de GRP e 2 com uso de placebo, não apresentando diferença estatística ($p = 0,375$). Não houve efeitos adversos, alterações dos sinais vitais ou variações laboratoriais associados ao uso de GRP em nenhum paciente. **Conclusões:** Os resultados deste estudo, apesar do tamanho reduzido da amostra, reforçam os dados anteriores sobre a segurança do GRP no uso a curto prazo. Apesar de ter ocorrido redução dos escores da escala ABC após uso de GRP, não houve diferença estatística em relação ao placebo. Devido ao desenho *crossover* e tamanho pequeno da amostra do estudo atual, não foi possível esclarecer a real eficácia do GRP na redução dos sintomas do TEA na infância. Existe a necessidade de novas pesquisas com outros delineamentos e tamanho amostral maior para confirmar a eficácia e segurança do GRP em crianças com autismo.

Palavras-chave: Peptídeo liberador de gastrina. Peptídeos bombesina. Neuropeptídeos. Transtornos do neurodesenvolvimento. Autismo. Transtorno do espectro autista.

ABSTRACT

Introduction: The neuropeptides regulate a variety of aspects of the nervous and neuroendocrine function, acting through activation of specific receptors of the cellular membrane. In system central nervous (CNS) the gastrin-releasing peptide receptors (GRPR) are widely expressed, and numerous central effects have been reported with their activation, including effects on satiety, regulating the circadian rhythm, thermoregulation, stress modulation, response to fear, anxiety and memory. Research has shown that pharmacological blockade of GRPR in animal models leads to the deficits in social interaction, restrictive patterns of behavior and motor stereotypies, autistic symptoms similar to human behavior, suggesting the possibility that the complex GRP/GRPR may have a role in the pathogenesis of autism spectrum disorder (ASD). Recently, two studies are not controlled with the administration of gastrin releasing peptide (GRP) to 13 children with autism suggest that it is safe and can improve some symptoms of the disorder, especially social interaction and symptoms associated with irritability. **Objectives:** To compare the efficacy, safety, tolerability GRP compared to placebo in ASD symptoms. **Methodology:** crossover clinical trial, randomized, double-blind, placebo-controlled, using GRP 160 picomol/kg for 4 consecutive days in 10 children with autism. Outcomes were measured by the Aberrant Behavior Checklist scale (ABC). **Results:** All participants were male, aged between 4 and 9 years. There was a reduction in the scores of the ABC range and its subscales after use GRP and placebo. Despite this reduction be more prominent with the GRP, particularly in subscales Irritability, Stereotypic behavior and Hyperactivity and noncompliance, there was no statistical difference between the results (p 0.334). After a week of infusion, 5 children showed improvement greater than 25% in the total score of the ABC scale in GRP use and 2 with placebo use, however there was no statistical difference (p 0.375). No adverse effects, changes in vital signs or laboratory abnormalities associated with use of GRP in any patient. **Conclusions:** The results of this study, despite the small sample size, reinforce previous data on the safety of the GRP in the short-term use. Although there was a reduction in ABC scale scores after use of GRP, there was no statistical difference from placebo. Due to the small sample size and design of the current study, it was not possible to clarify the real effectiveness of GRP in reducing the symptoms of ASD in childhood. There is a need for further research with other designs and larger sample size to confirm the efficacy and safety of GRP in children with autism.

Keywords: Gastrin-releasing peptide receptor. Bombesin-like peptides. Neuropeptides. Neurodevelopmental disorders. Autism. Autism spectrum disorder.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Logística do estudo	64
--------------------------------------	----

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Sítios genéticos potencialmente relacionados ao TEA	28
TABELA 2 – Síndromes genéticas e doenças metabólicas associadas ao TEA.....	30

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABA	<i>Applied Behavior Analysis</i>
ABC	<i>Aberrant Behavior Checklist</i>
CARS	<i>Childhood Autism Rating Scale</i>
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CGI-I	<i>Clinical Global Impression – Improvement Scale</i>
CGI-S	<i>Clinical Global Impression – Severity Scale</i>
CNVs	Variação no número de cópias
CPC	Centro de Pesquisas Clínicas
DSM-5	<i>Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition</i>
DSM-III	<i>Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Third Edition</i>
DSM-III-R	<i>Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Third Edition- Revised</i>
DSM-IV	<i>Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Edition</i>
EUA	Estados Unidos da América
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GAF	<i>Assesment Functioning Scale</i>
GRP	Peptídeo liberador de gastrina
GRPR	Receptor do peptídeo liberador de gastrina
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i>
PECS	<i>Picture Exchange Communication System</i>
PET	Tomografia com emissão de pósitrons
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog gene</i>

QI	Quociente de Inteligência
ReBEC	Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SSRI	Inibidores seletivos da recaptação da serotonina
SNC	Sistema nervoso central
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TDAH	Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade
TEA	Transtorno do Espectro Autista
TEACCH	<i>Treatment and Educational of Autistic and Related Communication-Handicapped Children Children</i>
TOC	Transtorno Obsessivo-Compulsivo
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1 TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA	16
2.1.2 Aspectos epidemiológicos	18
2.1.3 Manifestações clínicas	20
2.1.4 Diagnóstico	24
2.1.5 Etiologia.....	27
2.1.6 Neurobiologia.....	33
2.1.7 Tratamento.....	40
2.1.8 Prognóstico	46
2.2 PEPTÍDEO LIBERADOR DE GASTRINA	47
2.2.1 Peptídeo liberador de gastrina e seus receptores.....	47
2.2.2 Peptídeo liberador de gastrina e o sistema nervoso central.....	49
2.2.3 Peptídeo liberador de gastrina e estudos clínicos em humanos.....	51
2.2.4 Peptídeo liberador de gastrina e transtorno do espectro autista	52
3 JUSTIFICATIVA	56
4 OBJETIVOS	57
4.1 OBJETIVO GERAL	57
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	57
5 METODOLOGIA.....	58
5.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO	58
5.2 AMOSTRA.....	58
5.2.1 Critério de inclusão	58
5.2.2 Critérios de exclusão	59
5.3 INTERVENÇÃO.....	60

5.4 VARIÁVEIS EM ESTUDO.....	60
5.5 DESFECHO ESPERADO.....	60
5.6 FERRAMENTAS DE PESQUISA	61
5.6.1 <i>Aberrant behavior checklist</i>	61
5.7 LOCAL DE REALIZAÇÃO.....	61
5.8 LOGÍSTICA.....	62
6 ASPECTOS ESTATÍSTICOS.....	65
6.1 CÁLCULO DO TAMANHO DA AMOSTRA.....	65
6.2 ANÁLISE DOS RESULTADOS	65
7 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	67
8 REFERÊNCIAS	69
8 ARTIGO.....	89
9 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	110
APÊNDICE A – FICHA DE IDENTIFICAÇÃO DE VOLUNTÁRIOS.....	111
APÊNDICE B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	112
APÊNDICE C – EXAMES LABORATORIAIS PRÉ E PÓS GRP	116
APÊNDICE D – EXAMES LABORATORIAIS PRÉ E PÓS-PLACEBO	117

1 INTRODUÇÃO

O transtorno do espectro autista (TEA) é um distúrbio do desenvolvimento neurológico de base biológica caracterizado por deficiências em dois domínios principais: 1) déficits na comunicação e interação sociais e 2) padrões restritos e repetitivos de comportamento, interesses e atividades (ASSOCIATION, 2013). Dada a complexidade do TEA e a diversidade de manifestações clínicas, é provável que as interações entre vários genes, fatores epigenéticos e a exposição aos modificadores ambientais contribuam para sua expressão fenotípica tão variável (BACCHELLI; MAESTRINI, 2006; MUHLE; TRENTACOSTE; RAPIN, 2004; WILLSEY; STATE, 2015). O *Center for Disease Control and Prevention* (CDC) estimou em 2010 uma prevalência do transtorno em 14,7 por 1000 crianças (uma em 68), com idade de 8 anos, afetando um menino para cada 42 e uma menina para cada 189 (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2014). Esses dados estatísticos evidenciam o TEA como uma das desordens do desenvolvimento neurológico mais frequente, representando uma grande preocupação de saúde pública (BRENTANI et al., 2013) e gerando grandes custos econômicos e sociais (BUESCHER et al., 2014) além de sofrimento familiar (KARST; VAN HECKE, 2012; SMITH; GREENBERG; MAILICK, 2014; WEISS et al., 2012). Até o momento nenhum tratamento disponível é capaz de reverter completamente os principais sintomas do TEA (BENVENUTO et al., 2013; ROSSIGNOL, 2009). As terapias psicoeducacionais com foco no comportamento, comunicação e habilidades adaptativas continuam sendo o pilar do tratamento. Apesar de não existirem medicamentos aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) para tratar os sintomas nucleares do autismo, a farmacoterapia pode ser utilizada em crianças com TEA para melhorar os sintomas comumente associados, tais como hiperatividade, impulsividade, desatenção, agressividade, irritabilidade e ansiedade (TCHACONAS; ADESMAN, 2013).

Os receptores do peptídeo liberador de gastrina (GRPR) têm sido implicados em doenças do sistema nervoso central (SNC), incluindo transtornos do neurodesenvolvimento. Estudos sugerem que o bloqueio dos GRPR durante o desenvolvimento possa levar a alterações comportamentais compatíveis com TEA, e suportam a possibilidade de que uma expressão ou um funcionamento anormal dos GRPR nesse período possa ter um papel na patogênese da doença (GARCIA et al., 2010; MERALI et al., 2014; PRESTI-TORRES et al., 2007; ROESLER; SCHWARTSMANN, 2012).

O peptídeo liberador de gastrina (GRP) foi utilizado em dois ensaios clínicos em pacientes com autismo infantil. Houve respostas positivas variadas, com melhora principalmente na interação social e comunicação, além da redução de comportamentos repetitivos, irritabilidade e hiperatividade. O GRP também se mostrou seguro e bem tolerado. (observações não publicadas)

Nesse estudo foi administrado GRP endovenoso e placebo em crianças com TEA para avaliação de efeitos terapêuticos nos sintomas do espectro, além da sua tolerabilidade e segurança.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA

2.1.1 ASPECTOS HISTÓRICOS

A expressão “autismo” foi primeiramente utilizada em 1911 pelo psiquiatra suíço Eugen Bleuler para designar a perda de contato com a realidade (“uma retirada definitiva do mundo externo”), o que considerava um dos principais sintomas da esquizofrenia, termo também de sua autoria (BALBUENA RIVERA, 2007; VERHOEFF, 2013). No entanto, foi o psiquiatra infantil Leo Kanner (KANNER, 1942), a partir de uma amostra de 11 crianças com condutas não esclarecidas por nenhum sistema nosológico, quem descreveu pela primeira vez o autismo como uma síndrome comportamental caracterizada por alterações na linguagem ou na comunicação, nos relacionamentos sociais e na capacidade cognitiva (BALBUENA RIVERA, 2007; GREYDANUS; TOLEDO-PEREYRA, 2012). Kanner também observou respostas incomuns ao ambiente, que incluíam maneirismos motores estereotipados, resistência a mudanças ou insistência na monotonia (KANNER, 1942).

Em 1944, o pediatra austríaco Hans Asperger, desconhecedor do trabalho de Kanner, publicou um artigo em que descrevia crianças com características semelhantes aos dos pacientes de Kanner, exceto pela preservação da capacidade verbal e cognitiva. Por ter sido publicado em alemão, a pesquisa permaneceu restrita à comunidade científica de língua germânica até 1981, quando Lorna Wing o traduziu para o inglês. Para Wing, a Síndrome de Asperger (AS) não era uma condição separada do autismo, mas sim uma variação dentro do mesmo *continuum* do transtorno (GREYDANUS; TOLEDO-PEREYRA, 2012; VOLKMAR; MCPARTLAND, 2014; WING, 1981).

Nas primeiras décadas após a descrição de Kanner o interesse no autismo aumentou gradualmente. Neste período formaram-se linhas de trabalho focadas no potencial da psicopatologia parental como causa do autismo. Algumas escolas propunham a hipótese de que o autismo era uma reação psicológica a um distúrbio nas relações precoces, colocando a mãe como núcleo etiológico da patologia e propondo tratamentos de cunho analítico (PARELLADA et al., 2014). Houve também um forte movimento que indicava o transtorno como a primeira manifestação na infância de psicose ou esquizofrenia. No entanto, diversas linhas de evidência desafiaram estes pontos de vista. Em 1964 o trabalho pioneiro de Bernard Rimland, fundador da *Austim Society of America*, centrou-se em novas abordagens para o diagnóstico e forneceu um mecanismo neurobiológico hipotético para o autismo (GREYDANUS; TOLEDO-PEREYRA, 2012). Já em 1972, estudos fenomenológicos realizados por Kolvin e Rutter deixaram claro que o autismo era diferente esquizofrenia em termos de início, características clínicas e história familiar (KOLVIN, 1972; RUTTER, 1972). No final de 1970, os primeiros estudos de gêmeos sugeriram uma forte base genética para a condição. (VOLKMAR; MCPARTLAND, 2014).

Em 1980 essas linhas convergentes de investigação levaram a inclusão do "Autismo Infantil" como um diagnóstico oficialmente reconhecido no *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Third Edition* (DSM-III) (VOLKMAR; MCPARTLAND, 2014). No ano de 1987, o *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Third Edition-Revised* (DSM-III-R) instituiu critérios diagnósticos com uma perspectiva de desenvolvimento, e foram estabelecidos dois diagnósticos, encampados sob o termo Transtornos Invasivos (ou Global) do Desenvolvimento: (1) Autismo; e (2) Transtorno Invasivo (ou Global) do Desenvolvimento não especificado. Em 1994 o *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Edition* (DSM-IV) na tentativa de equilibrar a sensibilidade e especificidade da abordagem diagnóstica, mantendo uma definição flexível e

orientada para o desenvolvimento, criou 5 subgrupos dentro dos Transtornos Invasivos do Desenvolvimento: Autismo, Síndrome de Rett, Transtorno Desintegrativo da Infância, Transtorno Invasivo do Desenvolvimento Não-Especificado e Síndrome de Asperger (GADIA; TUCHMAN; ROTTA, 2004; TCHACONAS; ADESMAN, 2013). No início do ano de 2013, foi publicado nos Estados Unidos o *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition* (DSM-5), que optou por juntar todos os subgrupos sob o termo comum de TEA e classifica-los conforme a intensidade dos sintomas em leve, moderado e grave. O DSM-5 excluiu do grupo o Transtorno de Rett e o Transtorno Desintegrativo da Infância por serem distúrbios neurológicos com etiologia distinta (ASSOCIATION, 2013; VERHOEFF, 2013). A decisão de eliminar a Síndrome de Asperger ainda se mantém controversa no meio acadêmico (VOLKMAR; MCPARTLAND, 2014).

2.1.2 Aspectos epidemiológicos

Quando foi inicialmente descrito em 1942 (KANNER, 1942), o autismo era mencionado como uma condição rara, afetando não mais que 4 crianças por 100.000. O primeiro estudo epidemiológico sobre o autismo foi realizado apenas em 1966, por Victor Lotter (BRENTANI et al., 2013). Nesse estudo, ele relatou um índice de prevalência de 4,5 em 10.000 crianças em toda a população de crianças de 8 a 10 anos de Middlesex, um condado ao noroeste de Londres.

A prevalência estimada na década de 1980-1990 era de 4-5/10.000 habitantes. Na década 1990-2000, aumentou para 30-60/10.000 (POSADA-DE LA PAZ et al., 2005). Atualmente, acredita-se que o TEA afete cerca de 1% da população (SIMONOFF, 2012). Casos de TEA são identificados na população geral de pré-escolares em uma taxa aproximada de 0,8%, ao passo que, em escolares, adolescentes e adultos a taxa atinge 1%.

O último estudo realizado nos Estados Unidos da América (EUA) pelo CDC, no ano de 2010, evidenciou uma prevalência do transtorno de 14,7 por 1000 (uma em 68) crianças com idade de 8 anos, afetando 1 menino para cada 42 e uma menina para cada 189 (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2014). Esses últimos dados excedem os de anos anteriores, sendo 29% maior do que a estimativa de 2008 de 11,3 por mil, ou um em cada 88 crianças. As comparações adicionais entre a estimativa de 2010 e os outros anos mostram um aumento de 64% em relação a 2006 (9,0 por 1.000; uma em 110) e um aumento de 123% no período de 2002 (6,6 por mil; um em 150). (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2014). A idade de 8 anos foi escolhida pelo CDC por ser o pico de prevalência do transtorno.

No Brasil, um estudo piloto sobre a prevalência de TEA foi realizado num município do estado de São Paulo. O estudo incluiu 1470 crianças de 7 a 12 anos e foi baseada numa combinação de instrumentos padronizados e avaliação clínica, utilizando os critérios do DSM-IV. O pesquisa estimou a prevalência de TEA de 0,3%. Acredita-se que essa baixa frequência, discrepante dos estudos internacionais, tenha como principal causa o tamanho reduzido da amostra (PAULA et al., 2011).

Estudos epidemiológicos evidenciam uma maior incidência de autismo em meninos do que em meninas, com proporções médias relatadas de 3,5 a 4,0 meninos para cada menina. Essa preponderância ainda não é bem entendida e fatores genéticos, epigenéticos, hormonais e ambientais estariam implicados (SCHAAFSMA; PFAFF, 2014). A proporção do sexo masculino para feminino é ainda mais acentuada em indivíduos com nível intelectual mais elevado, para cerca de 11: 1 (GILLBERG et al., 2006). Entre os indivíduos diagnosticados com TEA sem quaisquer anormalidades físicas ou cerebrais, medidas por ressonância magnética nuclear (RMN), a proporção foi estimada foi tão elevada quanto 23: 1 (MILES; HILLMAN, 2000).

Atualmente há mais diagnósticos de autismo em crianças a cada ano nos EUA do que AIDS, câncer e diabetes combinados (TCHACONAS; ADESMAN, 2013). A prevalência do TEA o torna uma das desordens do desenvolvimento neurológico mais frequente, representando uma grande preocupação de saúde pública (BRENTANI et al., 2013) e levando a altos custos sociais e econômicos. O custo do suporte a um indivíduo com TEA e deficiência mental durante a sua vida foi avaliada em US\$ 2,4 milhões de dólares nos EUA e US\$ 2,2 milhões de dólares no Reino Unido. Os maiores componentes de destas despesas na infância foram os serviços de educação especial e perda de produtividade dos pais (BUESCHER et al., 2014). Provavelmente o aumento da incidência do TEA seja devido a combinação de diferentes fatores, principalmente, ao aumento do reconhecimento da patologia e a detecção precoce por pediatras e professores, além da ampliação do conceito de autismo com inclusão de fenótipos mais diversos. Nesse último se inclui a "aposição de diagnósticos" em que pacientes com outros diagnósticos prévios, como retardo mental, adicionalmente possuem critérios para também receber o diagnóstico de autismo. Outros fatores como idade materna e paterna avançada e o potencial efeito de toxinas ambientais estão sob investigação (PARELLADA et al., 2014).

2.1.3 Manifestações clínicas

O TEA é um distúrbio que se manifesta por uma grande variedade de sintomas nas áreas cognitiva, emocional e neurocomportamental. Apesar das características que o compõem serem bem definidas, a grande heterogeneidade dos achados em cada indivíduo torna o seu reconhecimento desafiador. O transtorno engloba fenótipos extremamente heterogêneos, principalmente nos casos mais brandos do espectro, e a gravidade dos déficits

centrais varia grandemente entre os pacientes (JOHNSON; MYERS, 2007; STANKOVIĆ; LAKIĆ; ILIĆ, 2012).

Os principais sintomas do espectro são déficits de interação social e comunicação; e padrões restritos e repetitivos de comportamento, interesses e atividades, que constituem a conhecida tríade diagnóstica de Wing. Embora esses sintomas possam ocorrer em uma variedade de transtornos psiquiátricos, é a junção deles em um mesmo indivíduo que torna o TEA único. Os sintomas também variam com a idade, durante a infância, as crianças com autismo costumam apresentar mais déficits de linguagem e agitação. Já na adolescência, os sintomas mais importantes podem ser os problemas de relacionamento e de modulação do humor (NAZEER; GHAZIUDDIN, 2012).

As dificuldades na interação social no TEA podem manifestar-se como isolamento ou comportamento social impróprio, pobre contato visual, dificuldade em participar de atividades em grupo, indiferença afetiva ou demonstrações inapropriadas de afeto e falta de empatia social ou emocional (GADIA; TUCHMAN; ROTTA, 2004; JOHNSON; MYERS, 2007).

As dificuldades na comunicação ocorrem em graus variados, tanto na habilidade verbal quanto não verbal de compartilhar informações com outros. Algumas crianças não desenvolvem habilidades de comunicação. Outras têm uma linguagem imatura, caracterizada por jargão, ecolalia, reversões de pronome, prosódia anormal e entonação monótona. Os que têm capacidade expressiva adequada podem ter inabilidade em iniciar ou manter uma conversação apropriada, dificuldades em compreender sutilezas de linguagem, piadas ou sarcasmo, bem como problemas para interpretar linguagem corporal e expressões faciais (GADIA; TUCHMAN; ROTTA, 2004). A falta da capacidade de formação de frases até os 5 anos de idade tem sido citado como um indício de desenvolvimento muito limitado de linguagem ao longo da vida (BRENTANI et al., 2013).

Os padrões repetitivos e estereotipados de comportamento característicos do autismo incluem resistência a mudanças, insistência em determinadas rotinas, apego excessivo a objetos e fascínio com o movimento de peças (tais como rodas ou hélices). Embora algumas crianças pareçam brincar, elas se preocupam mais em alinhar ou manusear os brinquedos do que em usá-los para sua finalidade simbólica. Estereotipias motoras e verbais, tais como se balançar, bater palmas repetitivamente, andar em círculos ou repetir determinadas palavras ou frases são também manifestações frequentes, presentes em 37 a 95% dos indivíduos com TEA (ASSOCIATION, 2013; FILIPEK et al., 2000; GADIA; TUCHMAN; ROTTA, 2004; KLIN, 2006).

Os pacientes com TEA também apresentam déficits no funcionamento executivo e na capacidade mental de resolver problemas, além de dificuldade de integrar informações para produção de um significado. Alterações no processamento sensorial são frequentes. Essas crianças e adolescentes podem apresentar tanto hipo quanto hipersensibilidade a estímulos sensoriais de uma mesma modalidade ou em múltiplos domínios sensoriais (visual, auditivo, olfativo, palatal e tátil) (ASSOCIATION, 2013; OLIVIE, 2012).

Hiperatividade, auto e heteroagressividade ocorrem em mais da metade dessas crianças. Comportamentos auto-agressivos são mais comuns entre pacientes com deficiência cognitiva e incluem bater a cabeça, tapas no rosto ou corpo, se morder, ou se beliscar. Os gatilhos para esses comportamentos podem ser previsíveis (frustração, ansiedade, excitação) ou aparentemente aleatórias. A falta de compreensão ou a incapacidade de se comunicar, ou a frustração total, podem levar a explosões de agressividade (KLIN, 2006).

Distúrbios do sono ocorrem em 44% a 83% dos pacientes com TEA. Usualmente iniciam aos dois anos de idade, com padrões erráticos de sono e despertares frequentes à noite. Os mais frequentes são a insônia inicial, o sonambulismo e as irregularidades no ciclo do sono (OLIVIE, 2012). Os distúrbios alimentares podem envolver a aversão a certos

alimentos pela textura, cor ou odor, a insistência em comer somente uma pequena seleção de alimentos e a recusa de provar alimentos novos (KLIN, 2006), e não tendem a melhorar ou desaparecer com a idade (OLIVIE, 2012). Distúrbios gastrointestinais também são comuns, como constipação crônica, dor abdominal com ou sem diarreia, refluxo gastroesofágico, distensão abdominal e deficiência de dissacaridases (BUIE et al., 2010; MCELHANON et al., 2014).

A comorbidade com patologias psiquiátricas é frequente no TEA. O DSM-5 aponta que 70% têm um transtorno mental comórbido e 40% tem dois ou mais transtornos mentais associados (ASSOCIATION, 2013). Dentre as comorbidades descritas com o TEA encontramos: transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH), transtorno bipolar, tiques, Síndrome de Tourette, transtorno obsessivo-compulsivo (TOC), esquizofrenia, ansiedade, transtorno opositor desafiante, transtorno de conduta, distúrbio alimentar, psicose, enurese, encoprese, distúrbios do sono e síndrome de estresse pós-traumático. Algumas dessas condições vão se desenvolver, em grande parte, durante a infância, enquanto outras são mais prevalentes e mais severas na idade adulta (KIELINEN et al., 2004; LEYFER et al., 2006; MAZZONE et al., 2014; MAZZONE; RUTA; REALE, 2012; MURRAY, 2010; RYBAKOWSKI et al., 2014; SIVERTSEN et al., 2012; SKOKAUSKAS; GALLAGHER, 2010; TURECK et al., 2014).

Aproximadamente 60-70% dos pacientes com TEA têm um certo nível de deficiência intelectual (LEVY; MANDELL; SCHULTZ, 2009). Inversamente, cerca de 10% dos indivíduos com TEA têm notáveis habilidades para a sua idade, os chamados “*savants*”, muitas vezes esses pacientes apresentam habilidades altamente restritas e especializadas muito superiores ao seu funcionamento global (KLIN, 2006).

A associação entre autismo e epilepsia é bem estabelecida, já sendo descrita por Kanner em 1943. Uma proporção significativa dos pacientes com TEA, cerca de 35%,

também tem diagnóstico de epilepsia. A frequência de epilepsia é maior em meninas, em pacientes com autismo secundário a uma etiologia subjacente identificável, aumentando também com a gravidade da deficiência intelectual (EL ACHKAR; SPENCE, 2015). Além disso, taxas de epilepsia são maiores com aumento da idade nessas crianças. Hara et al. em estudo retrospectivo com 130 indivíduos com TEA idiopático seguidos por 10 anos, encontraram nos pacientes com TEA e epilepsia valores de quociente de inteligência (QI) mais baixo e comportamentos adaptativos e sociais mais pobres em relação ao grupo com apenas TEA (HARA, 2007). As crises epiléticas são mais comuns na infância, com segundo pico na adolescência precoce. São descritos todos os tipos de crise epilética, incluindo casos de encefalopatias como espasmos infantis ou Síndrome de Lennox-Gastaut. No entanto, crises parciais complexas seriam as mais frequentes, ocorrendo em 68% dos indivíduos (MATSUO et al., 2010). Múltiplas alterações no eletroencefalograma foram descritas em pacientes com autismo, contudo, a região frontal parece ser a área mais comum de descargas epileptiformes (HASHIMOTO et al., 2001).

2.1.4 Diagnóstico

Na ausência de um marcador biológico, o diagnóstico do autismo e a delimitação dos seus limites permanecem uma decisão clínica (GADIA; TUCHMAN; ROTTA, 2004; GOLDANI et al., 2014). No DSM-5, "Transtorno do Espectro Autista" é o termo que substitui todas as subclassificações anteriormente utilizados no DSM IV-TR. A eliminação de transtorno de Asperger no DSM-5 tem sido compreensivelmente controverso, com dados na literatura que prestam serviços a retirada e também à manutenção do subtipo categórico. (KING et al., 2014).

O DSM-5 define o TEA por duas categorias de critérios principais, uma com três critérios de comunicação social (critério A) e outra com quatro critérios de comportamentos restritos e repetitivos (critério B). Não há mais uma categoria de comunicação separada como anteriormente (WILLIAMS et al., 2014). Além disso, hipo ou hipersensibilidade sensorial foram adicionadas a esse último grupo de sintomas (KING et al., 2014).

Critérios diagnósticos segundo o DSM-5 (ASSOCIATION, 2013):

- a) déficits persistentes na comunicação social e na interação social em múltiplos contextos, conforme manifestado pelo que segue, atualmente ou por história prévia:
- déficits na reciprocidade socioemocional, variando, por exemplo, de abordagem anormal e dificuldade para estabelecer uma conversa normal a compartilhamento reduzido de interesses, emoções ou afeto, a dificuldade para iniciar ou responder a interações sociais,
 - déficits nos comportamentos comunicativos não verbais usados para interação social, variando, por exemplo, de comunicação verbal e não verbal pouco integrada a anormalidades no contato visual e linguagem corporal ou déficits na compreensão e uso gestos, a ausência total de expressões faciais e comunicação não verbal,
 - déficits para desenvolver, manter e compreender relacionamentos, variando, por exemplo, de dificuldade em ajustar o comportamento para se adequar a contextos sociais diversos a dificuldade em compartilhar brincadeiras imaginativas ou em fazer amigos, a ausência de interesse por pares;
- b) padrões restritos e repetitivos de comportamento, interesses ou atividades, conforme manifestado por pelo menos dois dos seguintes, atualmente ou por história prévia:

- movimentos motores, uso de objetos ou fala estereotipados ou repetitivos,
 - insistência nas mesmas coisas, adesão inflexível a rotinas ou padrões ritualizados de comportamento verbal ou não verbal,
 - interesses fixos e altamente restritos que são anormais em intensidade ou foco,
 - hiper ou hiporreatividade a estímulos sensoriais ou interesse incomum por aspectos sensoriais do ambiente;
- c) os sintomas devem estar presentes precocemente no período do desenvolvimento (mas podem não se tornar plenamente manifestos até as demandas sociais excedam as capacidades limitadas ou podem ser mascarados por estratégias aprendidas mais tarde na vida);
- d) os sintomas causam prejuízo clinicamente significativo no funcionamento social, profissional ou em outras áreas importantes da vida do indivíduo no presente;
- e) essas perturbações não são mais bem explicadas por deficiência intelectual ou por atraso global do desenvolvimento. Deficiência intelectual e TEA costumam ser comórbidos; para fazer o diagnóstico da comorbidade de TEA e deficiência intelectual, a comunicação social deve estar abaixo do esperado para o nível geral de desenvolvimento.

O diagnóstico precoce alivia as preocupações prolongadas de muitas famílias e acelera oportunidades de beneficiar a criança com intervenções especializadas (ANAGNOSTOU et al., 2014). A Academia Americana de Pediatria recomenda a triagem para TEA em todas as crianças aos 18 anos e 24 meses de idade (ANAGNOSTOU et al., 2014; JOHNSON; MYERS, 2007). A triagem do TEA também é indicada em crianças com atraso nos marcos de linguagem/comunicação, em crianças com uma regressão em habilidades sociais ou de linguagem, e em crianças cujos pais levantem preocupações sobre TEA (JOHNSON; MYERS, 2007).

2.1.5 Etiologia

Um dos aspectos mais desconcertantes do TEA continua sendo sua etiologia. As causas suspeitas do TEA são tão diversas quanto o próprio espectro, e presumivelmente refletem o ambiente de início da vida da criança e herança genética (TCHACONAS; ADESMAN, 2013). A verdade inegável, quando se olha para todas as teorias atuais sobre a causa do TEA é que "é tempo para desistir de uma única explicação para o autismo" (HAPPÉ; RONALD; PLOMIN, 2006). Evidências para explicações genéticas para TEA ainda estão emergindo. Há uma porcentagem crescente de indivíduos com autismo sendo identificados com anormalidades genéticas e novos genes de "alto risco" sendo encontrados. É também provável que interações ambiente-gene sejam identificadas, dada a incompleta, mas alta, taxa de herdabilidade entre gêmeos. Fatores ambientais pré e perinatais que aumentam ou diminuem o risco de TEA ainda estão sendo explorados, e uma explicação para as taxas mais elevadas de TEA entre os meninos ainda está sendo procurada (WILLIAMS et al., 2014).

O papel da genética é fortemente sugerido pelo risco 15 a 20 vezes maior de recorrência em irmãos de crianças afetadas em comparação com a população geral e por 60 a 90% de concordância em gêmeos monozigóticos contra 10% em gêmeos dizigóticos (LEVY; MANDELL; SCHULTZ, 2009). A diferença entre as taxas de concordância entre monozigóticos e dizigóticos sugere interações entre os fatores de risco (gene-gene ou gene-ambiente) que poderiam resultar de fatores tóxicos ambientais ou epigenéticos, que alterariam o funcionamento do gene (LEVY; MANDELL; SCHULTZ, 2009). Estudos têm implicado várias regiões cromossômicas para a presença de loci de susceptibilidade. Como autismo não é uma entidade clínica única, pode ser visto como uma manifestação comportamental de dezenas ou talvez centenas de distúrbios genéticos. Estima-se que existam mais de 500 loci

genéticos distintos que podem ser relacionadas com TEA (GOLDANI et al., 2014; TCHACONAS; ADESMAN, 2013). Algumas das regiões mais frequentemente relatadas estão na Tabela 1 (SCHAEFER; MENDELSON; PROFESSIONAL PRACTICE AND GUIDELINES COMMITTEE, 2013).

Tabela 1 – Sítios genéticos potencialmente relacionados ao TEA

Região	Microarray	Deleção/Duplicação	Gene Candidato
1p	1p36.13	dup	
	1q21.1	dup	<i>HYDIN</i>
1q	1q41	del	<i>MARK1</i>
	2p16.3	del	<i>NRXN1</i>
2p	2q31.1	del,dup	<i>SLC25A12</i>
2q	2q37	del	<i>5-HTR2B</i>
	3q24	del, dup	<i>SLC9A9</i>
3q	5p15.1	del	
5p	7q11.23	dup	
	7q22.1	del	<i>RELN</i>
	7q31.2	del,dup	<i>FOXP2, WNT2, MET</i>
	7q35-q36	del	<i>EN2, CNTNAP2</i>
11q	11q13.3-q13.4	del	<i>SHANK2</i>
12q			
13q	13q14.2-q14.1	del	<i>5-HTR2A</i>
15q 11-13	15q11-13	dup	<i>UBE3A, SNRPN, CHRNA7</i>
	15q13.3	del	<i>CHRNA7</i>
	16p11.2	del, dup	
16p	16p13.11	del, dup	
	17p11.2	del, dup	
17p	17q11.2	del	<i>SLC6A4</i>
17q	17q21.3	del, dup	<i>ITGB3</i>
	18q21.1	del	<i>TCF4, MBD1</i>
18q			
21p			
22q	22q11.2	del	<i>CRKL, FGF8, TBX1</i>
	22q13.3	del	<i>SHANK3</i>
Xp	Xp22.31	del, dup	<i>NLGN4</i>
	Xq13.1	del, dup	<i>NLGN3</i>
Xq	Xq28	del	<i>MECP2</i>

Modificado de SCHAEFER; MENDELSON; PROFESSIONAL PRACTICE AND GUIDELINES COMMITTEE, 2013

Uma grande variedade de mecanismos genéticos pode estar envolvida, como desordens genéticas únicas, anormalidades cromossômicas e variação no número de cópias (CNVs). Esses diferentes mecanismos resultam em variados riscos de herdabilidade (OLIVIÉ, 2012). Alguns estudiosos dividem o autismo em subtipos na tentativa de melhor avaliar esses

padrões de herdabilidade. Formas “complexas” de autismo, que representam cerca de 20-30% dos casos, seriam aquelas com características gerais dismórficas e indicariam anomalias na morfogênese precoce; essas formas ocorrem com a mesma incidência em ambos os sexos e estão associadas com mau prognóstico. No autismo “complexo”, uma condição médica diagnosticável, anomalias citogenéticas ou defeitos de um único gene podem ser encontrados em 10-25%. Já as formas “essenciais” são caracterizadas pela ausência de características dismórficas, história familiar mais freqüente de autismo e maior frequência no sexo masculino; sua etiologia é raramente encontrada (MILES, 2011; PARELLADA et al., 2014).

A associação entre autismo e síndromes genéticas está bem estabelecida. Cerca de 3% dos autistas têm Síndrome do X-Frágil (LEVY; MANDELL; SCHULTZ, 2009), e aproximadamente um terço desses indivíduos tem autismo. Recomenda-se que todos os pacientes com TEA do sexo masculino sejam testados para X-frágil, e que a testagem ocorra no sexo feminino caso haja fenótipo compatível com X frágil, história familiar positiva para transtornos de neurodesenvolvimento ligadas ao X ou insuficiência ovariana prematura, ataxia ou tremores na paciente ou em familiares próximos (SCHAEFER; MENDELSON; PROFESSIONAL PRACTICE AND GUIDELINES COMMITTEE, 2013). Outras síndromes e doenças genéticas estão associadas ao TEA como as Síndromes de Angelmann, de Williams, de Moebius, entre outras descritas na Tabela 2. Juntas, elas correspondem a 10% de todos os casos (COHEN et al., 2005; MEFFORD; BATSHAW; HOFFMAN, 2012; OLIVIÉ, 2012). Síndromes genéticas ligadas ao *Phosphatase and tensin homolog gene* (PTEN) são frequentemente associadas com o autismo ou retardo mental. Os dados coletivos a partir de estudos identificaram mutações patogênicas no PTEN em 15 de 318 indivíduos (5%) com TEA. Uma análise retrospectiva desses dados mostrou que macrocefalia estava presente em todos os casos positivos (KING et al., 2014; MCBRIDE et al., 2010; SCHAEFER; MENDELSON; PROFESSIONAL PRACTICE AND GUIDELINES COMMITTEE, 2013).

Tabela 2 – Síndromes genéticas e doenças metabólicas associadas ao TEA

Síndrome do X Frágil	Síndrome de Cohen	Síndrome de Joubert
Síndrome de Smith–Magenis	Síndrome de Smith-Lemli-Opitz	Deficiência de Adenil-succinato liase
Neurofibromatose	Síndrome de San Filippo	Esclerose Tuberosa
Deleção do 22q.11	Deficiência de Creatina	Síndrome de Angelman
Fenilcetonúria	Síndrome de Down	Distrofia Muscular de Duchenne
Síndrome de CHARGE	Síndrome de Lange	Síndrome de Prader-Willi
Síndrome de Sotos	Síndrome de Cowden	Síndrome de Bannayan–Riley–Ruvalcaba

Adaptado de COHEN et al., 2005; SCHAEFER, G. B.; MENDELSON, N. J.; PROFESSIONAL PRACTICE AND GUIDELINES COMMITTEE, 2013.

Anormalidades cromossômicas casuais podem ser identificadas por técnica de hibridização genômica de *microarray*, aumentando a identificação de uma causa genética para 25% dos casos (MILES, 2011). Essa técnica permite a detecção de deleções e multiplicações submicroscópicas conhecidas como “variação no número de cópias” (CNVs). Com o aumento do número de estudos utilizando *microarray*, novas informações tem surgido quanto à contribuição da CNVs no TEA. As estimativas das frequências das CNVs em indivíduos com autismo são de 8-21%. Estudos recentes encontraram uma prevalência de 10% de CNVs clinicamente significativas em pacientes com o transtorno (SCHAEFER; MENDELSON; PROFESSIONAL PRACTICE AND GUIDELINES COMMITTEE, 2013; SEBAT et al., 2007; SHISHIDO; ALEKSIC; OZAKI, 2014) e mais de 100 alterações genômicas diferentes foram relatadas (BETANCUR, 2011). Entre essas, várias parecem ter uma associação especialmente forte, como o 15q11-q13 e o 22q13, sendo que o locus 16p11.2 foi reportado como apresentando CNVs em 0,5-1% de todos os indivíduos com autismo (SHISHIDO; ALEKSIC; OZAKI, 2014; WALSH; BRACKEN, 2011; WILLSEY; STATE, 2015). Um estudo brasileiro encontrou uma prevalência combinada de CNVs nos locus 15q11-q13, 16p11.2 e 22q13 em 2,1% de uma amostra de 531 indivíduos com TEA (MOREIRA et al., 2014).

Apesar da interpretação clínica das CNVs em pacientes com TEA permanecer um desafio, já que CNVs raras ou muito raras podem estar presentes em membros da família assintomáticos ou na população em geral (<0,5%) (MYERS; JOHNSON, 2007; OLIVIÉ, 2012), o estudo genômico por *microarray* tem se tornado o teste de primeira linha em substituição ao cariótipo para avaliação dos indivíduos com alteração no desenvolvimento (MILLER et al., 2010; SCHAEFER; MENDELSON; PROFESSIONAL PRACTICE AND GUIDELINES COMMITTEE, 2013).

Atualmente se estuda a possibilidade de que muitos efeitos genéticos devam-se mais a fatores epigenéticos do que a alterações na sequência do gene. A epigenética refere-se a alterações neuroquímicas que influenciariam a expressão do gene, seja ela específica aos tecidos ou ao desenvolvimento em determinadas fases. Os mecanismos epigenéticos permanecem incertos e há evidências limitadas de que eles possam estar envolvidos no TEA (RUTTER, 2011).

Até o momento, poucas causas não genéticas são reconhecidas no TEA, como encefalite herpética, infecções congênitas (ex. embriopatia por rubéola e citomegalovírus), síndrome alcoólico-fetal e exposição pré-natal ao ácido valpróico (MUHLE; TRENTACOSTE; RAPIN, 2004; OLIVIÉ, 2012). Alguns estudos sugerem que a exposição intra-útero a talidomida e ao misoprostol também seriam fatores de risco para autismo (MILES, 2011; MUHLE; TRENTACOSTE; RAPIN, 2004). Uma meta-análise com 40 estudos de fatores de risco perinatais e neonatais para o autismo encontrou pouca evidência para implicar um único fator na etiologia do TEA, no entanto, esta metanálise sugere que a exposição a várias complicações neonatais poderiam aumentar o risco de desenvolver o transtorno, dentre as mais fortemente associadas estão: a apresentação anormal, as complicações do cordão umbilical, o sofrimento fetal, a lesão ou trauma do nascimento, o nascimento múltiplo, a hemorragia materna, o nascimento no verão, o baixo peso ao

nascimento, ser pequeno para a idade gestacional, malformação congênita, o Apgar baixo no quinto minuto, dificuldade de alimentação, aspiração de mecônio, a anemia neonatal, a incompatibilidade ABO ou Rh e a hiperbilirubinemia. (GARDENER; SPIEGELMAN; BUKA, 2011). Outra metanálise, do mesmo grupo, com fatores de risco pré-natais sugere que a idade avançada dos pais, o uso materno de medicação pré-natal, o sangramento na gestação, o diabetes gestacional, a ordem de nascimento (ser o primeiro ou o terceiro filho em diante) e ter uma mãe imigrante (GARDENER; SPIEGELMAN; BUKA, 2009) estariam associados ao aumento do risco para desenvolver o TEA. Num estudo de coorte retrospectivo avaliando 95 mil crianças, a vacina tríplice viral (sarampo, caxumba e rubéola) não foi associada com um risco aumentado de TEA, mesmo em crianças com irmãos mais velhos com autismo (JAIN et al., 2015). Estudos tem evidenciado que o aumento da idade materna é um fator de risco para o transtorno, tanto independentemente quanto em combinação com o aumento da idade paterna (KONG et al., 2012; SANDIN et al., 2012; TORIELLO, 2012).

Numerosas anormalidades metabólicas tem sido associadas ao fenótipo do autismo. Esses distúrbios metabólicos são relativamente raros, tipicamente autossômico recessivos e presentes no início da vida. Além disso, a maioria dessas desordens está associada com outros sintomas clínicos, como convulsões, sinais extrapiramidais, retardo de crescimento ou neuroregressão (SCHAEFER; MENDELSON; PROFESSIONAL PRACTICE AND GUIDELINES COMMITTEE, 2013).

A literatura sugere uma ligação entre a disfunção mitocondrial e TEA. Semelhante as causas metabólicas, essas patologias apresentam outros sintomas associados, como hipotonia, regressão do desenvolvimento e disfunção de múltiplos órgãos (SCHAEFER; MENDELSON; PROFESSIONAL PRACTICE AND GUIDELINES COMMITTEE, 2013). Numa revisão de 25 pacientes com doença mitocondrial que se apresentou inicialmente como

TEA, todos os pacientes tinham exame neurológico anormal e/ou uma elevada concentração de lactato no plasma (WEISSMAN et al., 2008).

Níveis médios plasmáticos de alguns neuropeptídeos como substância P, peptídeo intestinal vasoativo, polipeptídeo ativador de adenilato ciclase pituitária, peptídeo calcitonina-relacionado e neurotrofina teriam uma concentração mais elevada no sangue do cordão umbilical de crianças que mais tarde receberam o diagnóstico de autismo ou retardo mental em relação a controles (NELSON et al., 2001).

Várias linhas de pesquisa diferentes sugerem uma associação entre o TEA e resposta imunológica, contudo, a relevância e implicações dessas diferentes associações não são bem compreendidas. Enquanto alguns estudos sugerem que a resposta imune materna para infecção pré-natal poderia ser responsável por muitos casos de autismo, outros estudos identificaram alterações da resposta imune em crianças com TEA (TCHACONAS; ADESMAN, 2013) e alguns investigadores encontraram um aumento dos níveis de citocinas nessas crianças (ASHWOOD et al., 2011; TCHACONAS; ADESMAN, 2013). Outra correlação descrita é existência de um histórico familiar de doenças auto-imunes e o diagnóstico de TEA. Em um grupo de crianças com autismo infantil, houve uma frequência significativamente maior de artrite reumatóide materna, doença celíaca materna e diabetes tipo 1 materna ou paterna. O sistema de genes do *Human leukocyte antigen* (HLA), que têm sido implicado numa causa do autismo infantil, seria o mecanismo de base (TORIELLO, 2012).

2.1.6 Neurobiologia

Devido à grande heterogeneidade na forma como o TEA se expressa, não é surpresa que tentativas de se identificar uma teoria explicativa única para o autismo tenham sido

fracassadas (LEVY; MANDELL; SCHULTZ, 2009). Os achados neurobiológicos suportam diferentes teorias. Por ser uma desordem do desenvolvimento, pesquisadores têm estudado o crescimento cerebral e suas redes de funcionamento, neuropatologia, neurofisiologia e neuroquímica. Esses estudos indicam que há diferenças fundamentais no crescimento e na organização cerebral em indivíduos com TEA por um longo período, que pode ir desde a vida pré-natal até a vida adulta. A associação do aumento do risco de autismo com a exposição pré-natal a teratógenos, como a talidomida e o ácido valpróico, sugerem que insultos precoces durante períodos críticos do desenvolvimento cerebral possam ser suficientes para causar o transtorno (MYERS; JOHNSON, 2007). Raramente, um único fator genético ou ambiental parece ser a etiologia de um dado caso (tais como esclerose tuberosa, síndrome do X-frágil ou síndrome fetal do ácido valpróico) (PARELLADA et al., 2014).

As informações sobre a neuropatologia do autismo são poucas. Bauamn e Kemper originalmente encontraram que as células do sistema límbico (hipocampo, amígdala, corpos mamilares, giro anterior do cíngulo e núcleos do septo) eram menores nos cérebros de indivíduos autistas (BAUMAN; KEMPER, 1985), o que levou os autores a postularem um atraso no desenvolvimento maturacional dos circuitos do sistema límbico. Até o momento, nenhum achado neuropatológico específico para o TEA foi encontrado (SILVER; RAPIN, 2012)

A macrocefalia é encontrada na idade entre 2-3 anos em 20% das crianças com TEA, em alguns estudos, até 90% dos casos apresentam o perímetro cefálico acima da média para idade (COURCHESNE et al., 2001; KING et al., 2014; PARELLADA et al., 2014). Supõe-se que crescimento cerebral aceleraria aos 12 meses de idade em paralelo ao surgimento dos principais sintomas do espectro (MINSHEW; WILLIAMS, 2007; REDCAY; COURCHESNE, 2005). Estudos de RMN do volume total do cérebro demonstram que crianças com TEA (idades 18 meses a 4 anos) têm o volume cerebral 5-10% maior em

comparação com controles normais. Esse aumento parece estar relacionado com o aumento tanto da matéria cinzenta quanto da substância branca, mas sem aumento ventricular (CHEN; JIAO; HERSKOVITS, 2011; PIVEN et al., 1995). Esse crescimento encefálico exagerado estaria associado com padrões anormais de crescimento nos lobos frontais, temporais e estruturas do sistema límbico, como a amígdala. Essas áreas cerebrais estão implicadas no desenvolvimento social, na comunicação e nas habilidades motoras, funções que estão prejudicadas no TEA (CHEN; JIAO; HERSKOVITS, 2011; SCHULTZ, 2005). Outro achado em RMN é a redução do volume do corpo caloso em adolescentes e adultos jovens com TEA (PIVEN et al., 1997). Essa redução de tamanho poderia diminuir a conectividade inter-hemisférica e estaria envolvida na fisiopatologia das alterações cognitivas e características clínicas do transtorno (VERHOEVEN et al., 2010).

Apesar das diferentes variações anatômicas estarem presentes nos diversos estudos, o aumento do volume dos lobos frontais tem sido o achado mais consistente (STIGLER et al., 2011). Em análise pós-morte de crianças com autismo encontrou-se 67% mais neurônios no córtex pré-frontal (média, 1,94 bilhões) em comparação com crianças do grupo controle (1,16 bilhões), além disso, em comparação com o peso normativo cerebral para idade, o peso cerebral dos autistas diferia por uma média de 17,6%, enquanto os controles diferiam por uma média de 0,2% (COURCHESNE et al., 2011). Stoner et al. (2014) encontraram focos de citoarquitetura anormal e desorganização cortical laminar de neurônios, mas não da glia, no tecido pré-frontal e temporal, em 10 casos de uma amostra de 11 pacientes autistas, enquanto em apenas 1 de 11 crianças não afetadas.

O cerebelo, além da função motora, também é reconhecido por seu papel na modulação das emoções, da linguagem e das funções executivas (HODGE et al., 2010). Estudos volumétricos do vérmis e de todo o cerebelo foram realizados em indivíduos com TEA. Uma metanálise demonstrou diminuição do volume do vérmis nos lobos VI e VII em

crianças jovens com autismo (STANFIELD et al., 2008). Ao contrário do vérmis, pesquisas têm mostrado aumento do volume no restante do cerebelo (STIGLER et al., 2011). Recente estudo revelou uma correlação entre o grau de redução da substância cinzenta no lóbulo VII e a gravidade dos sintomas na interação social, comunicação e comportamentos repetitivos (D'MELLO et al., 2015). Uma diminuição do número de células de Purkinje e uma redução de 24% no tamanho médio dessas células foi relatada em pacientes com autismo (VERHOEVEN et al., 2010). Vários estudos em nível molecular sugerem o papel do cerebelo na patogênese da desordem, com trabalhos encontrando redução da enzima ácido glutâmico-decarboxilase nos cerebelos de pacientes com TEA. Alterações nos sistemas gabaérgico, glutamatérgico e colinérgico também são relatados (SHAKIBA, 2014). Técnicas de imagem funcional durante tarefas que estão relacionados com domínios disfuncionais em autistas, como atividade motora, sensorial e atencional também revelaram uma atividade cerebelar aberrante (SHAKIBA, 2014).

A amígdala possui importante papel na emoção e no comportamento social. Estudos em humanos e em primatas associam essa estrutura com um papel no processamento da face (RUTISHAUSER; MAMELAK; ADOLPHS, 2015). Semelhante a outros achados de neuroimagem no autismo, as pesquisas sobre o seu volume ainda são inconsistentes, principalmente por variações fisiológicas que ocorrem nas diferentes idades (CHEN; JIAO; HERSKOVITS, 2011; STANFIELD et al., 2008; STIGLER et al., 2011). O volume da amígdala parece estar aumentado em crianças com autismo menores que 10 anos (SCHUMANN et al., 2004), havendo correlação positiva entre o volume da amígdala e o prejuízo social e comunicativo no grupo autista (SCHUMANN et al., 2009). Em contraste, pesquisas que incluem adolescentes ou adultos têm encontrado volume da amígdala normal ou menor que em controles, sugerindo que o seu crescimento seja similar ao do restante do cérebro em indivíduos com TEA (CHEN; JIAO; HERSKOVITS, 2011; STIGLER et al.,

2011). A avaliação pós-morte da amígdala de adolescentes e adultos do sexo masculino com autismo revelou que, em média, existem menos neurônios nos pacientes acometidos do que nos controles (SCHUMANN; AMARAL, 2006). Contudo, na análise da glia, não houve diferença em número ou tamanho das células não-neuronais (MORGAN et al., 2014). Uma avaliação da amígdala esquerda e do córtex órbito-frontal bilateral usando espectroscopia em crianças com TEA mostrou que concentrações de N-acetil-aspartato nessas regiões foram significativamente menores em comparação com o grupo controle, o que sugere a presença de disfunção neuronal na amígdala e no córtex órbito-frontal no autismo (MORI et al., 2015).

Estudos sugerem diminuição do volume de estruturas possivelmente afetadas no transtorno, como a ínsula anterior, que integra múltiplos sistemas neurocognitivos associados à afetividade e à empatia (KOSAKA et al., 2010); o giro frontal inferior, que atua na memória de trabalho e na comunicação; o córtex cingulado que age na orientação viso-espacial e na memória funcional. Não foram encontradas diferenças no volume do tálamo em relação a controles (STIGLER et al., 2011).

Várias pesquisas têm utilizado avaliações de imagem funcional para avaliar resposta a estímulos auditivos e visuais ou em testes cognitivos, com grande contribuição para o entendimento da neurobiologia dos déficits de linguagem e de comunicação (BRAMBILLA et al., 2004). Os achados sugerem que o autismo está associado a um padrão anormal de ativação auditiva do córtex temporal esquerdo. Como a região temporal esquerda está implicada na organização cerebral da linguagem, essa ativação anormal do hemisfério esquerdo poderia estar envolvida nos prejuízos de linguagem e na resposta comportamental inadequada aos sons dos autistas (ZILBOVICIUS; MERESSE; BODDAERT, 2006). Avaliações com RMN cerebral funcional tem encontrando alterações no giro frontal inferior (área de Broca) e no *planum temporale* esquerdo (área de Wernicke), com diminuição da ativação na primeira e maior ativação na segunda em comparação com controles. Esse padrão

sugere que esses indivíduos tenham uma tendência a processos mais extensos de reconhecimento de palavras individuais e de integração a uma estrutura contextual coerente (STIGLER et al., 2011).

O giro fusiforme é mais fortemente ativado durante a percepção facial do que durante a percepção de qualquer outro tipo de estímulo visual, sendo conhecida como área facial fusiforme, já nos pacientes com TEA existe uma ativação significativamente menor em comparação aos controles em vários estudos funcionais (ZILBOVICIUS; MERESSE; BODDAERT, 2006). Resultados apontam para a ausência da área seletiva de voz no autismo, com diferenças significativas no padrão de ativação cerebral durante a percepção da voz em indivíduos com autismo em comparação a controles normais. A combinação dos resultados de percepção anormal de voz com a não ativação da área da face durante a percepção facial poderia explicar porque os indivíduos com TEA são conhecidos pelas dificuldades de perceber estímulos socialmente significativos como rostos humanos (ZILBOVICIUS; MERESSE; BODDAERT, 2006).

Inflexibilidade cognitiva e comportamentos perseverantes podem se dever a uma dificuldade de se desengajar de tarefas prévias após mudanças de paradigmas, possivelmente resultante de uma desconexão com a rede de inibição, composta pelo giro cingulado e pela ínsula, no circuito fronto-parietal (BELGER et al., 2011).

A investigação neuroquímica com modelos animais e estudos com drogas permanece inconclusiva. Alterações na serotonina e em seus transportadores podem ter algum papel no desenvolvimento do TEA, assim como os sistemas dopaminérgicos, glutamatérgico e colinérgico (LAM; AMAN; ARNOLD, 2006). Estudos utilizando tomografia com emissão de pósitrons (PET) encontraram uma diminuição no funcionamento dopaminérgico no córtex pré-frontal, com aumento nos transportadores desse neurotransmissor em todo o cérebro, com exceção da região estriatal e do cerebelo (CHUGANI, 2012). Embora existam evidências do

potencial envolvimento de vários neurotransmissores, as alterações mais consistentemente encontradas envolvem a serotonina. Em 1961, Schain e Freedman (1961) relataram aumento da serotonina sérica em um terço dos seus pacientes com TEA. Desde então, dois principais tipos de alterações têm sido encontradas. A primeira refere-se à capacidade de todo o cérebro de produzir serotonina. Em crianças não autistas, a síntese de serotonina é maior do que 200% dos valores de adultos antes dos 5 anos, quando então declinam até atingir os valores de adultos. Em contraste, em crianças autistas, a capacidade de síntese da serotonina aumenta gradualmente entre as idades de 2 e 15 anos até os valores normais de adultos. Esses dados sugerem que humanos são submetidos a um período na infância precoce de grande síntese de serotonina, e que esse processo de desenvolvimento está alterado em indivíduos com TEA. O segundo tipo de alteração encontrada são anormalidades focais na síntese de serotonina no SNC. Estudos com PET mostram diminuição de captação nos córtex frontal, tálamo e cerebelo. Além desses achados, também foram encontrados diminuição de transportadores e de receptores da serotonina em crianças e adultos com autismo (CHUGANI, 2012).

Estudos relatam anormalidades no cromossoma 15 em autistas, especificamente 15q11 ao 15q13, região que possui genes que codificam subunidades do receptor GABA A, assim como diminuição do seu receptor. Outro neurotransmissor que tem sido estudado em TEA nos últimos 10 anos é o N-acetil-aspartato, com a maioria dos estudos mostrando diminuição da sua concentração em todo o cérebro, embora seu papel ainda não esteja bem esclarecido. Pesquisas com glutamato e glutamina permanecem muito iniciais pela incapacidade de separá-los na RMN com espectroscopia. Alguns trabalhos sugerem que esses estejam aumentados nas regiões da amígdala e do hipocampo, outros que esteja diminuído de forma global na substância cinzenta, incluindo cerebelo (CHUGANI, 2012).

2.1.7 Tratamento

Apesar do avanço no diagnóstico precoce e nas intervenções, nenhum tratamento disponível até o momento é capaz de reverter completamente os principais sintomas do TEA (BENVENUTO et al., 2013; ROSSIGNOL, 2009). Terapia educacional com foco no comportamento, comunicação e habilidades adaptativas continuam sendo o pilar do tratamento para o TEA. Apesar da inexistência de medicamentos para o tratamento específico do autismo, os fármacos são muitas vezes úteis no alívio de diferentes sintomas associados ao transtorno, incluindo hiperatividade e irritabilidade. Uma gama de terapias alternativas existem, embora tenham muito pouco de embasamento científico para apoiar sua utilização (TCHACONAS; ADESMAN, 2013).

2.1.7.1 Tratamento não farmacológico

Existem muitas abordagens terapêuticas disponíveis para o autismo infantil, incluindo intervenções educativas, análise comportamental aplicada, ensino estruturado, intervenção parental-mediada, terapias de fala e linguagem e terapias para habilidades sociais. Grande parte das crianças com autismo são tratadas com combinações dessas terapias. Infelizmente, os estudos sobre a eficácia da maioria dessas intervenções têm problemas metodológicos importantes, o que resulta na falta de provas para apoiar recomendações em diretrizes clínicas sobre autismo (AL-QABANDI; GORTER; ROSENBAUM, 2011).

Existem evidências de que maior intensidade do tratamento não farmacológico (horas por semana) e uma maior duração (em meses) leva a melhores resultados. Crianças com TEA devem ter acesso a pelo menos 25 horas por semana de intervenção abrangente para

desenvolver a comunicação e a linguagem, melhorar habilidades sociais e reduzir comportamento desajustado (MAGLIONE et al., 2012).

Brentani et al. (2013) descrevem as características essenciais das intervenções eficazes em crianças com TEA:

- a) início dos programas de intervenção o mais precocemente possível;
- b) tratamento intensivo, 5 dias por semana, durante um mínimo de 5 horas por dia;
- c) uso de planos de ensino estruturados e repetidos distribuídos em breves períodos de tempo;
- d) atenção de adultos suficientemente individualizada;
- e) inclusão da família, incluindo a formação dos pais;
- f) mecanismos de avaliação contínua com correspondentes ajustes na programação.

A falta de progressos significativos em qualquer domínio durante um período de 3-6 meses deve levar modificação do método de tratamento ou de sua intensidade (BRENTANI et al., 2013).

Dentre os modelos de terapia intervencionista encontram-se o *Applied Behavior Analysis* (ABA), *Treatment and Educacional of Autistic and Related Communication-Handicapped Children* (TEACCH) e *Developmental Individual Difference Relations-Ship-Based Approach* (Floortime) (WARREN et al., 2011). Atualmente os programas de intervenção baseados no ABA são vistos como primeira linha para o tratamento de TEA na infância (BRENTANI et al., 2013).

O ABA é a ciência de modificação de comportamento em que os procedimentos derivam dos princípios da aprendizagem operacionalizada e são aplicados para melhorar o comportamento social adaptativo e a aquisição de novas competências através da prática intensiva e repetida. O método ABA permite ganhos substanciais para crianças com autismo no quociente de inteligência, linguagem, desempenho acadêmico e comportamento

adaptativo, com significativa melhora no comportamento social em comparação com crianças com transtorno autista em grupos controle. É considerado o tratamento de escolha para a educação de crianças com autismo (TCHACONAS; ADESMAN, 2013).

O método TEACCH foi desenvolvido na Universidade da Carolina do Norte em 1972. Desde então tem sido amplamente incorporado aos sistemas de educação norte-americana e tem contribuído para estruturar as intervenções em autismo. A abordagem do TEACCH é o ensino estruturado, baseando-se na organização do ambiente e das atividades de maneira que possam ser compreendidas pelos indivíduos, potencializando seus pontos fortes como as habilidade visuais (BRENTANI et al., 2013). Uma metanálise com 13 estudos e totalizando 172 indivíduos encontrou efeitos positivos de pequena magnitude com essa técnica de tratamento, necessitando de novas avaliações de sua eficácia (VIRUES-ORTEGA; JULIO; PASTOR-BARRIUSO, 2013).

Nas terapias comportamentais não intervencionistas destaca-se o método *Picture Exchange Communication System* (PECS), que é um sistema de comunicação funcional, utilizando figuras. Esse modelo ajuda autistas não verbais ou com linguagem deficitária a se comunicar, diminuindo a frustração causada pelo déficit de comunicação. Estudos avaliando sua eficácia o consideram um método promissor (GANZ et al., 2012), assim como a musicoterapia (KIM; WIGRAM; GOLD, 2008).

2.1.7.2 Tratamento farmacológico

Atualmente não existem medicamentos disponíveis para tratar os déficits de comunicação e interação social do autismo, embora este seja um assunto de intensos esforços de investigação (BRENTANI et al., 2013). Apesar dos diferentes níveis de suporte empírico para os medicamentos direcionados, o tratamento medicamentoso de crianças e adultos com

TEA é prática clínica comum. Em torno de 45-75% das crianças com TEA são medicadas com drogas psicotrópicas (BRENTANI et al., 2013). Os medicamentos mais comumente prescritos, a fim de frequência, são os antidepressivos, antipsicóticos, anticonvulsivantes, e estimulantes, muitos deles sem estudos definitivos que orientem o seu uso. A maioria da utilização de psicofármacos em TEA é *off-label*, existindo atualmente apenas dois medicamentos (risperidona e aripiprazol) aprovados pelo FDA (KAPLAN; MCCRACKEN, 2012). A decisão de prescrever medicamentos deve ser feita caso a caso após intervenções não farmacológicas terem sido tentadas (TCHACONAS; ADESMAN, 2013).

A primeira e segunda gerações de antipsicóticos demonstraram moderados a grandes benefícios no controle de sintomas agressivos em autismo (NAZEER, 2011). Em 2002, um ensaio clínico multicêntrico avaliou a eficácia de risperidona a curto e longo prazo em crianças e adolescentes com autismo acompanhado por acessos de raiva, agressividade, comportamentos autolesivos. Os resultados mostraram que a resposta a risperidona a curto prazo foi marcadamente superior ao placebo (75 vs. 12%), com a redução de comportamentos disruptivo em geral, incluindo a diminuição da irritabilidade, hiperatividade e estereotipias. Risperidona foi bem tolerada por até seis meses e efeitos colaterais encontrados em estudos anteriores com haloperidol foram comparativamente menores com a risperidona. Sonolência e ganho de peso foram os efeitos colaterais mais comumente relatados (BRENTANI et al., 2013; MCCRACKEN et al., 2002).

Recentemente, o FDA aprovou o aripiprazol para tratamento da irritabilidade em crianças com autismo com idade de 6-17 anos com sintomas graves. Dois ensaios clínicos duplo-cego e placebo controlado mostraram que o aripiprazol é eficaz no tratamento de irritabilidade, hiperatividade e estereotipias em TEA. Além disso, o aripiprazol tem sido bem tolerado e é associado a um menor ganho médio de peso em comparação com outros antipsicóticos atípicos (BRENTANI et al., 2013; CURRAN, 2011; MARCUS et al., 2009;

OWEN et al., 2009). É importante ressaltar que risperidona e aripiprazol estão associados a eventos metabólicos adversos, como ganho de peso, dislipidemia e hiperglicemia (YOUNG; FINDLING, 2015).

Dois ensaios clínicos randomizados com poucas crianças com TEA usando haloperidol mostraram efeitos positivos significativos sobre os sintomas comportamentais. Usando escalas de sintomas autistas, Miral et al. compararam os efeitos do tratamento com haloperidol e risperidona, sendo o último superior apenas para o total de pontos da escala (MIRAL et al., 2008). Esses estudos sugerem um papel positivo de haloperidol para o tratamento de crianças com autismo grave ou refratário. No entanto, os efeitos colaterais extrapiramidais são comuns com haloperidol, aumentando a preocupação com possíveis efeitos a longo prazo da exposição nessa população (BRENTANI et al., 2013).

A maioria dos estudos com inibidores seletivos da recaptção da serotonina (SSRIs) mostraram falta de eficácia clinicamente significativa no tratamento de comportamentos repetitivos e restrição de interesses dos pacientes. Apenas um estudo metodologicamente relevante mostrou algum resultado positivo com fluoxetina em comparação com o placebo, mas as melhoras eram pequenas (BRENTANI et al., 2013; HOLLANDER et al., 2005). Existem evidências limitadas da eficácia do SSRIs em adultos a partir de pequenos estudos em que o risco de viés não é clara (WILLIAMS et al., 2013). Da mesma forma, crianças com TEA são frequentemente muito ansiosas, o que pode levar a problemas de comportamento importantes. Embora não existam estudos que demonstraram que os SSRIs sejam eficazes na redução da ansiedade em crianças com autismo, esses medicamentos são, por vezes, prescritos com base na sua demonstrada eficácia na população geral (TCHACONAS; ADESMAN, 2013).

Os sintomas de déficit de atenção e hiperatividade são muito comuns em indivíduos com TEA, afetando entre 28-74% dessa população, e nenhuma medicação é aprovada pelo

FDA para TDAH em pacientes autistas (TCHACONAS; ADESMAN, 2013). O metilfenidato tem se mostrado eficaz em melhorar os sintomas de TDAH nessas crianças (YOUNG; FINDLING, 2015), apesar de menores taxas de repostas positivas (ANTSHEL; ZHANG-JAMES; FARAONE, 2013). Os indivíduos com TEA e TDAH têm maior risco de sofrer efeitos adversos do tratamento estimulante do que as crianças com desenvolvimento típico com TDAH (ANTSHEL; ZHANG-JAMES; FARAONE, 2013; MURRAY, 2010). Atomoxetina ou agonistas alfa-2 podem ser utilizados para tratar hiperatividade ou impulsividade, especialmente em crianças para as quais estimulantes não foram eficazes ou bem tolerados (TCHACONAS; ADESMAN, 2013; YOUNG; FINDLING, 2015).

O ácido valpróico pode ser eficaz no tratamento de irritabilidade e comportamentos repetidos em crianças com TEA, mas os resultados não foram consistentes. Ensaio com lamotrigina e levetiracetam não demonstraram eficácia na melhora comportamental (POLITTE; HENRY; MCDUGLE, 2014). Um estudo mostrou que topiramato em combinação com a risperidona pode ser benéfica para melhorar problemas de comportamento em crianças com autismo (REZAEI et al., 2010; YOUNG; FINDLING, 2015).

Os problemas do sono também são comuns em crianças autistas. A melatonina parece ser eficaz quando administrada antes de dormir (TCHACONAS; ADESMAN, 2013). Como um todo, verificou-se que a literatura suporta a existência de um efeito benéfico da melatonina sobre o sono nesses indivíduos, com apenas poucos e menores efeitos colaterais (GUÉNOLÉ et al., 2011).

O sistema da oxitocina foi identificado como sendo envolvido no comportamento social e os dados pré-clínicos têm sido promissores. Um estudo de RMN funcional recente em crianças com TEA observou que a oxitocina intranasal reforça a atividade no cérebro em resposta a estímulos sociais. Entretanto, outros ensaios clínicos com autistas não conseguiram demonstrar sua eficácia na melhoria comportamental após quatro dias a oito semanas de

tratamento (TCHACONAS; ADESMAN, 2013; YOUNG; FINDLING, 2015). A secretina é um das substâncias mais extensivamente estudadas, no entanto, uma revisão com 16 ensaios não encontrou nenhuma evidência de que a secretina seria eficaz na melhora dos principais sintomas do TEA (WILLIAMS; WRAY; WHEELER, 2012). Estudos com memantina e N-acetilcisteína também estão ocorrendo, ainda sem resultados (POLITTE; HENRY; MCDOUGLE, 2014).

Trabalhos indicam que 50-75% das crianças com TEA são tratadas com medicina complementar e alternativa. Mudanças na dieta muitas vezes são feitas para melhorar ou aliviar os sintomas comuns nessas crianças. As intervenções nutricionais mais comuns são dieta sem glúten e dieta livre de caseína. Contudo, nenhum estudo metodologicamente rigoroso comprovou melhora. A suplementação com ômega-3, vitamina B6, magnésio, vitamina B12 é frequente, mas necessita de estudos para comprovação dos efeitos (TCHACONAS; ADESMAN, 2013).

2.1.8 Prognóstico

Dados recentes sugerem que os resultados das intervenções em crianças com TEA podem ser altamente variáveis. Crianças com autismo podem diferir consideravelmente no início e no acompanhamento da patologia, não apenas em termos de gravidade, mas também no que diz respeito a deficiências de desenvolvimento associados, condições médicas e comorbidade psiquiátrica (TCHACONAS; ADESMAN, 2013). Os mais importantes fatores determinantes de prognóstico parecem ser os testes de funcionamento intelectual realizados na infância e escores de QI, que tendem a permanecer relativamente estáveis com o passar do tempo. Enquanto estudos prévios mostravam melhores desfechos com QI superior a 50, um novo estudo encontrou que apenas indivíduos autistas com QI superior a 70 tinham melhor

prognóstico (HOWLIN et al., 2004; HOWLIN; MAWHOOD; RUTTER, 2000). No entanto, mesmo nesse grupo de indivíduos, os desfechos eram muito variáveis, pois os déficits fundamentais do autismo, principalmente rituais e comportamentos estereotipados, podem prejudicar o melhor desempenho esperado pelo QI maior (HOWLIN et al., 2004; HOWLIN; MAWHOOD; RUTTER, 2000). O desfecho também parece ser pior naqueles que falham em adquirir linguagem funcional até a idade de 5-6 anos (BRENTANI et al., 2013; HOWLIN et al., 2004)

O nível socioeconômico está implicado como um fator significativo para o melhor desenvolvimento, pois engloba variáveis do ambiente como a tipo de casa e bairro, além da qualidade de tratamento, educação e o acesso a serviços e a intervenções precoces (TCHACONAS; ADESMAN, 2013).

Infelizmente, apenas uma pequena minoria de indivíduos com TEA consegue trabalhar, viver de forma independente e desenvolver relacionamentos sociais significativos. A maioria permanece muito dependente do suporte dos pais ou de outros cuidadores. Poucos se casam e a maioria estuda em classes especiais (HOWLIN et al., 2004).

2.2 PEPTÍDEO LIBERADOR DE GASTRINA

2.2.1 Peptídeo liberador de gastrina e seus receptores.

Neuropeptídeos regulam uma variedade de aspectos da função nervosa e neuroendócrina, atuando através da ativação de receptores específicos da membrana celular que são membros superfamília dos receptores acoplados à proteína G. Levam a estimulação de vias de sinalização a jusante de proteína-quinase e, por fim, alteram a expressão gênica (ROESLER; SCHWARTSMANN, 2012).

A família de peptídeos da bombesina recebe esse nome incomum a partir da terminologia original utilizada em 1970 por Erspamer et al. para nomear um peptídeo isolado a partir da pele de um anfíbio europeu da espécie *Bombina bombina* (ERSPAMER; ERPAMER; INSELVINI, 1970; JENSEN et al., 2008). Posteriormente, foram isolados em mamíferos dois outros peptídeos da mesma família, o peptídeo liberador de gastrina (GRP) (MCDONALD et al., 1979) e a neuromedina B (MINAMINO; KANGAWA; MATSUO, 1983).

O GRP é um peptídeo mamífero de 27 aminoácidos, originalmente isolado de tecido gástrico porcino, compartilhando com a bombesina uma sequência de sete aminoácidos terminais, o que é essencial para a imunogenicidade e para uma ligação de alta afinidade ao receptor do GRP. Dessa maneira, o GRP e a bombesina apresentam essencialmente efeitos semelhantes na atividade biológica (JENSEN et al., 2008). Em condições fisiológicas, o GRP é encontrado no plasma humano em concentrações próximas a 15 picomol/L (40ng/L) (CLIVE; JODRELL; WEBB, 2001).

O GRP age pela ligação ao receptor GRP (GRPR, também conhecido como receptor BB2) encontrado na superfície celular de vários tecidos (GUO; QU; QIN, 2015; ROESLER et al., 2014), e possui uma elevada homologia (90% identidade de aminoácidos) com os receptores BB2 de ratos (CORJAY et al., 1991). O GRPR foi o primeiro tipo de receptor de bombesina a ser clonado, inicialmente a partir de células de murinos (BATTEY et al., 1991). Além do GRPR, a família dos receptores de bombesina também compreende ao receptor de neuromedina B (NMBR ou do receptor BB1) e o receptor de bombesina órfão de subtipo-3 (BRS-3 ou do receptor BB3). Enquanto a bombesina e o GRP se ligam com alta afinidade ao GRPR, a neuromedina B liga-se seletivamente ao NMBR. Nenhum ligando nativo foi identificado para o BRS-3 órfão (JENSEN et al., 2008; WEBER, 2009).

O gene codificador do GRPR tem como localização cromossômica o Xp22.2-p22.13 (JENSEN et al., 2008; XIAO et al., 2001), e possui 384 aminoácidos (WEBER, 2009). O GRPR mRNA é expresso em fases embrionárias precoces no SNC e em outros sistemas. Na maioria dos locais, os níveis de GRPR mRNA aumentam de forma constante ao longo do desenvolvimento embrionário e desaparecem abruptamente no momento do nascimento. Assim, acredita-se que o desenvolvimento adequado do SNC poderia requerer uma sinalização mediada por receptores de GRP (BATTEY; WADA; WRAY, 1994; MARUI et al., 2004).

2.2.2 Peptídeo liberador de gastrina e o sistema nervoso central

O sistema GRP/GRPR influencia um largo espectro de processos fisiológicos em vários sistemas, incluindo regulação térmica, glicemia, alimentação, liberação de somatostatina e gastrina, secreção de ácido gástrico, secreção pancreática, motilidade gastrointestinal, desenvolvimento pulmonar, percepção da dor, prurido, formação e expressão da memória, respostas ao estresse, proliferação celular e quimiotaxia no sistema imunológico (ROESLER et al., 2014; ROESLER; SCHWARTSMANN, 2012).

No SNC os receptores GRPR são amplamente expressos, e numerosos efeitos centrais têm sido descritos com a sua ativação, incluindo efeitos sobre a memória, a saciedade, a regulação do ritmo circadiano, a termorregulação, a modulação do stress e a resposta ao medo e à ansiedade. Sua expressão na medula espinhal está associada à sensação de prurido e à função sexual masculina. (GONZALEZ et al., 2008; GUO; QU; QIN, 2015; LIU et al., 2014; MOODY; MERALI, 2004; ROESLER; HENRIQUES; SCHWARTSMANN, 2006; SAKAMOTO et al., 2008; SUN; CHEN, 2007; WEBER, 2009, 2015)

Avaliações imuno-histoquímicas encontraram GRPR em tecido cerebral normal, sendo detectado nos neurônios, mas não em células gliais (FLORES et al., 2010). Propõe-se que no SNC o GRPR seja expresso nas membranas neuronais pós-sinápticas, com elevados níveis de expressão no hipotálamo, tronco cerebral e telencéfalo. O GRP seria liberado de neurônios glutamatérgicos, agindo como um neurotransmissor que regula a excitabilidade neuronal (SHUMYATSKY et al., 2002).

De particular interesse é a alta expressão do GRPR nas regiões límbicas do cérebro, incluindo o hipocampo e amígdala, que desempenham um papel importante na emoção, interação social e atenção. Na amígdala, subpopulações de receptores de GRP presentes em neurônios gabaérgicos teriam papel na mediação da memória através modulação da liberação de neurotransmissores na rede gabaérgica local (CHAPERON et al., 2012; KAMICHI et al., 2005; SHUMYATSKY et al., 2002). Nessa estrutura estes receptores são particularmente abundantes no núcleo lateral, uma região que sofre um padrão anormal de desenvolvimento pós-natal em vários transtornos de neurodesenvolvimento, incluindo esquizofrenia, ansiedade na infância e transtornos do espectro do autista (KAMICHI et al., 2005; MERALI et al., 2014). Estudos também verificaram que baixas concentrações exógenas de GRP poderiam induzir à estimulação do núcleo paraventricular talâmico, que participa na excitação, motivação e resposta ao estresse (HERMES et al., 2013).

Em modelos animais, a administração sistêmica de GRP ou da bombesina facilita a formação da memória (FLOOD; MORLEY, 1988; RASHIDY-POUR; RAZVANI, 1998). Os efeitos facilitadores sobre a função cognitiva também são observados quando o GRP ou a bombesina são injetados diretamente em estruturas cerebrais envolvidas na sua formação e regulação, como o hipocampo dorsal e o núcleo do trato solitário (ROESLER; HENRIQUES; SCHWARTSMANN, 2006; WILLIAMS; MCGAUGH, 1994). Por outro lado, a administração sistêmica ou intracerebral de um antagonista do GRPR prejudica a sua

formação (ROESLER et al., 2003, 2004a, 2004b; ROESLER; HENRIQUES; SCHWARTSMANN, 2006). O papel do GRP na formação da memória é indicado também por evidências genéticas mostrando alterações de plasticidade sináptica em camundongos *knockout* que não expressam o GRPR (SHUMYATSKY et al., 2002). O GRP e o GRPR parecem atuar de forma mais seletiva como reguladores dos aspectos emocionais relacionados às memórias e da formação de memórias com conteúdos afetivo e aversivo (LUFT et al., 2006; ROESLER et al., 2004b; ROESLER; HENRIQUES; SCHWARTSMANN, 2006; SHUMYATSKY et al., 2002).

Vários estudos pré-clínicos usando modelos roedores sugerem que o GRP e a bombesina podem atenuar ou prevenir déficits cognitivos em modelos de doenças neurodegenerativas e psiquiátricas. Nos modelos de déficits cognitivos induzidos por escopolamina ou hipóxia em camundongos, a administração sistêmica de GRP reverte os déficits cognitivos (SANTO-YAMADA; YAMADA; WADA, 2001). Além disso, demonstrou-se que a administração de bombesina previne o prejuízo de memória em ratos tratados com administração do fragmento 25-35 do peptídeo beta-amilóide no hipocampo dorsal, um modelo de perda cognitiva associada à doença de Alzheimer (ROESLER et al., 2006). Esses dados indicam que o tratamento com GRP pode atenuar a disfunção de memória em modelos experimentais de Alzheimer.

2.2.3 Peptídeo liberador de gastrina e estudos clínicos em humanos

O GRP foi administrado em voluntários humanos para avaliação de seus efeitos sobre a dilatação vascular e o comportamento alimentar. Em um estudo, 7 voluntários saudáveis receberam infusões braquiais de GRP em concentrações de 3 a 450 picomol/min. O GRP induziu efeitos vasodilatadores transitórios, com volta aos valores normais em cerca de 20

min (CLIVE; JODRELL; WEBB, 2001). Em outro ensaio, o GRP foi administrado por via intravenosa nas doses de 10, 40 ou 160 picomol/kg por hora em voluntários saudáveis do sexo masculino, e foram avaliados o comportamento alimentar e a saciedade. Houve uma redução significativa na ingestão calórica e uma redução de aproximadamente 19% na ingestão de alimento (GUTZWILLER et al., 1994).

2.2.4 Peptídeo liberador de gastrina e transtorno do espectro autista

2.2.4.1 Estudos genéticos

Estudos genéticos em humanos têm proposto que o gene GRPR possa ser um locus candidato para o autismo infantil. Uma translocação X:8 no primeiro íntron do gene do GRPR foi identificada numa paciente com exostose múltipla e autismo acompanhado de retardo mental e epilepsia (ISHIKAWA-BRUSH et al., 1997). Outro relato de caso já havia descrito um paciente com autismo e uma duplicação de Xp22.1–p22.3, onde o gene do GRPR está localizado (RAO et al., 1994). Uma pesquisa japonesa com pacientes autistas e indivíduos saudáveis avaliou dois sítios polimórficos no segundo éxon do gene GRPR, utilizando como base dados do estudo americano prévio que excluiu o gene GRPR como um locus candidato para a síndrome de Rett (HEIDARY et al., 1998). As frequências alélicas e distribuições de genótipos não foram significativamente diferentes entre os pacientes e controles (MARUI et al., 2004). Em 2008, um estudo italiano com 149 pacientes, apesar de associar um papel potencial das mutações da cisteína na posição 6 e leucina na posição 181 na função do GRPR, e possivelmente na patogênese das perturbações autistas em dois pacientes, não conseguiu comprovar essas ligações com a gênese do transtorno autista, indicando que uma melhor

compreensão das vias de sinalização ligados a esse receptor, especialmente em células neurais, se faz necessária (SEIDITA et al., 2008).

2.2.4.2 Estudos avaliando GRP em modelos animais

Pesquisas mostraram que o bloqueio farmacológico do GRPR em ratos durante o período neonatal leva ao desenvolvimento de déficits tardios e permanentes na interação social, como a frequência de contato e tempo de interação social (PRESTI-TORRES et al., 2007, 2012). Além disso, estudos com o bloqueio do GRPR de ratos no período neonatal também mostram redução da preferência ao odor materno em testes realizados para avaliar o comportamento de apego em ratos recém-nascidos (GARCIA et al., 2010). Recente estudo foi consistente com os achados anteriores, verificando que após o bloqueio do receptor GRPR durante os primeiros 10 dias de vida em ratos, houve aparecimento de deficiências marcantes da interação social. Além disso, observou-se que esse o bloqueio causou padrões restritivos de comportamento e estereotipias motoras, bem como aumento da expressão de medo aprendido nesses animais (MERALI et al., 2014). Como esses sintomas são semelhantes ao comportamento autista em humanos, sugere-se que o bloqueio neonatal do GRPR poderia servir como um modelo animal de autismo, sendo útil para obter uma melhor compreensão das perturbações do desenvolvimento neurológico.

2.2.4.3 Estudos avaliando a administração de GRP em crianças com autismo.

2.2.4.3.1 Estudo piloto

Um estudo piloto foi realizado com 3 pacientes com autismo infantil clássico com o objetivo de avaliar a segurança, tolerabilidade e duração dos possíveis efeitos terapêuticos da infusão de GRP na dose de 160 picomol/kg por 4 dias consecutivos.

Os pacientes foram avaliados através da aplicação de testes padrões (*Childhood Autism Rating Scale - CARS; Global Assessment Functioning Scale - GAF, Clinical Global Impression - CGI*), previamente a infusão de GRP e uma semana após a aplicação. Os pacientes foram acompanhados durante 4 semanas para reavaliação dos sintomas do espectro e de possíveis efeitos indesejáveis.

Dois dos três pacientes tiveram melhora em alguns sintomas de interação social, de comportamentos repetitivos e de comunicação. O outro paciente apresentou melhora muito discreta, apenas na comunicação. Pela impressão da família, na *Clinical Global Impression – Severity Scale (CGI-S)* não houve modificação do grau de doença nos pacientes, mas na *Clinical Global Impression – Improvement Scale (CGI-I)* o primeiro paciente estava melhor e o segundo e terceiro paciente estavam ligeiramente melhor. Não houve modificação nos valores da GAF pré e pós-infusões.

O peptídeo foi bem tolerado pelos três pacientes. Não houve qualquer efeito adverso durante as infusões e o seguimento dos pacientes. Um segundo ciclo de infusão foi realizado após 2 semanas do primeiro, com resultados semelhantes. (artigo submetido).

2.2.4.3.2 Ensaio Clínico

Foi realizado um ensaio clínico com 10 crianças com autismo infantil clássico com objetivo de avaliar o efeito do GRP na dose de 160 picomol/kg por 4 dias consecutivos nos sintomas do espectro. Os pacientes foram avaliados previamente através da CARS, CGI, GAF e *Aberrant behavior checklist* (ABC) (lista de checagem de comportamento) e na semana seguinte a infusão do GRP.

Dentre os 10 participantes, seis (60%) apresentaram melhora com o GRP, sendo considerada resposta positiva valores de 1 (muito melhor) ou 2 (melhor) na CGI e melhora \geq 25% em pelo menos uma das subescalas da ABC.

Na análise das subescalas da ABC, 8 pacientes apresentaram melhora nas subescala Irritabilidade e Hiperatividade (80%), 7 nas subescalas Comportamento estereotipado e Letargia e Esquiva social (70%) e 4 na subescala Fala inapropriada (40%). Os maiores tamanhos de efeito foram encontrados nas subescalas Irritabilidade e Letargia e Esquiva social. As diferenças encontradas tiveram significância estatística nas 5 subescalas.

Na CARS, houve uma redução média de 4 pontos entre os escores pré e pós GRP ($p=0,001$). A análise dos dados da ADI-R mostrou melhora significativa apenas no domínio que avalia interação social, com diminuição média de 2,4 pontos pós GRP.

O GRP foi bem tolerado na maioria dos pacientes. Não houve efeitos adversos graves ou alterações significativas na frequência cardíaca e na pressão arterial de nenhuma criança. Efeitos adversos ocorreram em 3 participantes, sendo náuseas (20%), diarreia (20%), vômitos (10%) e rash cutâneo (10%). Todos os 10 pacientes completaram o estudo. O tempo de duração do efeito do GRP, medido de forma subjetiva pela impressão dos pais, variou de 1 a 4 semanas, durando até 2 semanas em 8 pacientes. (artigo em submissão).

3 JUSTIFICATIVA

O TEA é um distúrbio crônico e na maioria das vezes com graves prejuízos no funcionamento cognitivo, emocional e comportamental. A maioria dos pacientes apresenta déficit cognitivo moderado ou grave, e não adquirem capacidade de viver de forma independente. A prevalência do TEA o torna uma das desordens do desenvolvimento neurológico mais frequente, representando uma grande preocupação de saúde pública, gerando altos custos econômicos para a sociedade e sofrimento para a família. Até o momento, não há nenhum tratamento capaz de reverter completamente os sintomas do autismo, e o tratamento medicamentoso diminui apenas sintomas mal-adaptativos.

Os resultados dos estudos anteriores com GRP em crianças autistas sugerem que o peptídeo é bem tolerado e que possa ser efetivo em melhorar sintomas do autismo, principalmente déficits de interação social e sintomas associados à irritabilidade. Como os estudos anteriores não foram cegos e não tinham grupo controle, não é possível aferir o efeito placebo e o viés do observador nos resultados. Assim, os resultados de eficácia, tolerabilidade e tamanho de efeito podem ter sido superestimados.

Estudos com caráter cego e controlados por placebo com a administração de GRP em crianças e adolescentes com autismo são necessários para melhor avaliar a sua eficácia e a sua segurança a curto prazo. Esta é a razão do presente estudo.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito do GRP na dose de 160 picomol/kg nos sintomas do espectro autista (interação social, comunicação e comportamentos restritos e estereotipados) em sujeitos pediátricos com diagnóstico de TEA.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) verificar a variação da escala ABC através da diferença entre os escores basal e de seguimento;
- b) avaliar a segurança e a tolerabilidade da administração parenteral de curto prazo do princípio ativo – GRP;
- c) avaliar o possível efeito placebo.

5 METODOLOGIA

5.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Ensaio clínico, tipo *crossover*, monocêntrico, randomizado, duplo cego em sujeitos com diagnóstico de autismo.

5.2 AMOSTRA

A amostra foi obtida por conveniência. A pesquisa foi divulgada no ambulatório de TEA do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) por meio de cartazes e em meio de comunicação (jornal de grande circulação). Os voluntários receberam um termo de esclarecimento e uma ficha que deveria ser preenchida pelo médico assistente e entregue aos pesquisadores caso houvesse interesse em participar da pesquisa. A seleção seguiu a ordem de entrega das fichas, incluindo no estudo os 10 primeiros voluntários em acordo com os critérios de seleção.

5.2.1 Critério de inclusão

- a) diagnóstico de autismo de acordo com os critérios do DSM-5, confirmado pelo julgamento do investigador;
- b) idade entre 3 e 9 anos;
- c) neuroimagem normal (tomografia computadorizada ou ressonância magnética de crânio);

- d) investigação genética normal (cariótipo para meninas; cariótipo e pesquisa de X-Frágil para meninos);
- e) sujeitos em uso de tratamento psicofarmacológico considerado adequado pelo investigador, em dose estável por no mínimo 4 semanas antes da inclusão, sem necessidade de adequação da dose ao longo do estudo.

5.2.2 Critérios de exclusão

- a) história de diabetes mellitus;
- b) presença de autismo secundário ou doenças com características comuns a autismo, como a seguir: diagnóstico de Síndrome de X frágil, Síndrome de Rett, Síndrome de Angelman, Síndrome de Prader-Willi e Síndrome de Smith-Lemli-Opitz, Esclerose Tuberosa;
- c) ser portador de qualquer condição associada ao aumento da secreção ácida no sistema gastrointestinal (gastrite, úlcera gástrica, úlcera duodenal, esofagite de refluxo);
- d) história de cardiopatia;
- e) qualquer condição que, no parecer do investigador, colocaria a segurança do sujeito em risco após a exposição à substância em estudo;
- f) residir fora da região metropolitana de Porto Alegre;
- g) pais ou responsáveis se negarem a assinar o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

5.3 INTERVENÇÃO

Os sujeitos foram submetidos a dois ciclos de infusões endovenosas, com duração de 4 dias cada e intervalo de 3 semanas entre eles. Em um dos ciclos foi infundido GRP na dose de 160 picomol/kg por dia, no outro soro fisiológico (placebo).

O GRP humano utilizado no estudo foi sintetizado pela empresa *Sigma-Aldrich Co*, de *Saint Louis, Missouri, USA* e está disponível no mercado internacional, sendo adquirido pela equipe de pesquisa (lote número 091M8712V; 21/05/2013; 1mg; 97% \geq puro por HPLC). Apresenta níveis de pureza adequados para ensaios clínicos.

5.4 VARIÁVEIS EM ESTUDO

Nesse estudo foram avaliadas as seguintes variáveis:

- a) pontuação na escala ABC e suas subescalas: I- Irritabilidade, Agitação e Choro; II- Letargia e Esquiva social; III- Comportamento estereotipado; IV- Hiperatividade; V- Fala inapropriada;
- b) possível efeito placebo;
- c) tolerância às infusões de GRP;
- d) possíveis efeitos adversos.

5.5 DESFECHO ESPERADO

Espera-se como desfecho da intervenção uma diminuição dos escores do instrumento utilizado na avaliação dos sintomas do TEA com diferença do GRP em relação ao placebo.

5.6 FERRAMENTAS DE PESQUISA

5.6.1 *Aberrant behavior checklist*

A escala ABC é um questionário constituído por 58 itens, elaborados para avaliação de sintomas comportamentais em população com retardo mental. É um dos instrumentos mais utilizados para avaliação de tratamentos nesse grupo de indivíduos. Seu uso em sujeitos com TEA já foi testado, mostrando alta validade interna e externa.

A escala ABC apresenta 58 itens divididos em 5 subescalas:

- a) I – Irritabilidade, Agitação e Choro (15 itens);
- b) II – Letargia e Esquiva social (16 itens);
- c) III – Comportamento estereotipado (7 itens);
- d) IV – Hiperatividade (16 itens);
- e) V – Fala inapropriada (4 itens).

Para cada item há as seguintes opções de pontuação: 0- não é problema; 1- o comportamento é um problema, mas em grau leve; 2- o problema tem gravidade moderada; 3- o problema é grave (AMAN et al., 1985; LOSAPIO et al., 2011).

5.7 LOCAL DE REALIZAÇÃO

As infusões de GRP foram realizadas em leitos da sala de infusões do Centro de Pesquisas Clínicas (CPC) do HCPA. As entrevistas e os encontros com os pais e ou responsáveis foram realizadas no ambulatório do HCPA.

5.8 LOGÍSTICA

Duas semanas antes do início das infusões os pais e/ou responsáveis assinavam o TCLE e os pacientes começavam o uso oral de omeprazol 2mg/kg/dia. O uso dessa medicação objetivou reduzir o efeito do GRP na liberação de gastrina e o risco de efeitos adversos secundários ao aumento da secreção de ácidos no trato gastrointestinal. Esse era mantido até o término das avaliações. Na literatura, não há citação de que o uso de omeprazol possa interferir nos sintomas do TEA.

No dia anterior às infusões os pais e/ou responsáveis respondiam a escala ABC aplicadas por um dos pesquisadores.

Os sujeitos foram divididos 2 braços de tratamento (A e B), cada braço com 5 sujeitos, randomizados na proporção 1:1. A randomização foi feita por método simples, através de sorteio.

Na primeira parte da pesquisa o grupo A recebeu infusão de GRP enquanto o grupo B recebeu placebo. Na segunda parte (*crossover*), o grupo B recebeu infusão de GRP enquanto o grupo A recebeu placebo (Figura 2). Os sintomas do espectro autista foram avaliados através das escala ABC pré-infusão e uma semana pós-infusão de GRP e placebo.

As bolsas contendo GRP e soro fisiológico (placebo) eram idênticas em volume e aspecto. Os pais e/ou responsáveis, os médicos e a equipe de enfermagem que participaram diretamente da pesquisa eram cegos quanto à substância que estava sendo infundida.

As infusões eram realizadas em 30 minutos, ficando o paciente em observação quanto ao surgimento de possíveis efeitos colaterais por 1 hora após o seu término. Durante esse período, o paciente era acompanhado por um dos médicos pesquisadores com monitorização dos sinais vitais e de possíveis efeitos colaterais. Após, o paciente e sua família eram liberados e estimulados a seguirem sua rotina diária habitual. Para minimizar possível viés, o

pesquisador responsável pela aplicação das escalas era cego quanto à alocação no tratamento. Para melhor avaliar os efeitos adversos da administração do GRP, foram coletadas 4 amostras de sangue por sujeito. Uma imediatamente antes da primeira infusão (GRP ou placebo) e outra antes da infusão do quarto dia. Nessas amostras foram analisados os seguintes exames: hemograma com plaquetas, transaminase glutâmica oxalacética (TGO), transaminase glutâmica pirúvica (TGP), amilase, bilirrubina total e frações, gama glutamil transpeptidase (gama-GT), glicose, uréia e creatinina.

Os pesquisadores ficaram disponíveis aos familiares constantemente durante toda a pesquisa. Essa seria prontamente interrompida se surgissem sintomas colaterais moderados, severos ou difíceis de tratar ou a qualquer momento, se assim fosse a vontade dos responsáveis pela criança.

6 ASPECTOS ESTATÍSTICOS

6.1 CÁLCULO DO TAMANHO DA AMOSTRA

Cálculo do N baseado na fórmula para comparação de 2 médias:

$$n = \frac{2 * (Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2 * \sigma^2}{d^2}$$

Considerando-se:

- significância 5%; poder de 80%;
- desvio-padrão médio de 4,265 ($\sigma = 4,265$) (desvio-padrão da diferença entre pré e pós-infusão da escala ABC do estudo piloto foi de 4,265);
- diferença mínima significativa da escala ABC de 5 pontos ($d = 5$), baseado na literatura.

Assim, foi estimado para cada braço 4 sujeitos, totalizando 8 sujeitos. Para esse protocolo, optou-se por uma amostra 20% maior, totalizando 10 sujeitos.

6.2 ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os dados foram armazenados em banco de dados criado em planilha Excel e posteriormente transportados para o software Stata e *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS).

Na análise descritiva, foram utilizados média, desvio padrão, valor mínimo e valor máximo para as variáveis quantitativas e as frequências absolutas e relativas para as variáveis qualitativas.

Os dados foram armazenados em banco de dados e analisados no software Stata e *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS), versão 22.0. Os escores da escala ABC, em uso de GRP e de placebo, foram comparadas através de análise de variância (ANOVA) com modelo ajustado para o delineamento *crossover* e através do teste de McNemar para amostras pareadas. Para significância estatística, foi considerado um valor de p igual ou menor a 0,05.

7 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA (registro no Grupo de Pesquisas do HCPA 14-0011). Os pais e/ou responsáveis assinaram o TCLE, já que os pacientes incluídos no estudo são menores de idade.

O estudo seguiu todos os aspectos éticos e metodológicos da Resolução 466/12 - Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos, e Resolução 251/97 - Normas de Pesquisa com Novos Fármacos, Medicamentos, Vacinas e Testes Diagnósticos Envolvendo Seres Humanos e foi publicado no Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos (ReBEC) registro RBR-8cq282.

Os pacientes foram constantemente avaliados durante toda a pesquisa. Essa seria prontamente interrompida se surgissem sintomas colaterais moderados, severos ou difíceis de tratar ou a qualquer momento, se assim fosse a vontade dos pais e/ou responsáveis pela criança.

A dignidade e o bem estar dos pacientes incluídos no estudo prevaleceram sobre quaisquer outros interesses, sejam econômicos, da ciência ou da comunidade.

Este foi um projeto acadêmico, sem qualquer vínculo com a indústria farmacêutica ou patrocínio. Por seu caráter exploratório, não havia previsão de manutenção de tratamento com GRP após o período preconizado. Havendo um claro benefício nesses pacientes, os autores realizarão um estudo de modelo animal com a administração do GRP a longo prazo para avaliação de possíveis efeitos tóxicos. Se esse estudo mostrar segurança no uso prolongado de GRP e se houver aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA para a extensão do seu uso em pacientes que apresentaram inequívoca melhora clínica, os autores se comprometem a garantir seu suprimento gratuito através da Fundação *South American Office for Anticancer Drug Development*.

A sua futura submissão aos órgãos regulatórios dependerá da confirmação do potencial terapêutico da intervenção, com base nas observações derivadas destes estudos limitados somados a estudos futuros com maior poder, bem como dos resultados dos estudos toxicológicos.

8 REFERÊNCIAS

AL-QABANDI, M.; GORTER, J. W.; ROSENBAUM, P. Early autism detection: are we ready for routine screening? **Pediatrics**, v. 128, n. 1, p. e211-217, July 2011. Disponível em: <<http://pediatrics.aappublications.org/content/128/1/e211.long>>. Acesso em: 19 set.2015.

AMAN, M. G. et al. The aberrant behavior checklist: a behavior rating scale for the assessment of treatment effects. **American Journal of Mental Deficiency**, v. 89, n. 5, p. 485-491, Mar. 1985.

ANAGNOSTOU, E. et al. Autism spectrum disorder: advances in evidence-based practice. **CMAJ: Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne**, v. 186, n. 7, p. 509-519, 15 Apr. 2014.

ANTSHEL, K. M.; ZHANG-JAMES, Y.; FARAONE, S. V. The comorbidity of ADHD and autism spectrum disorder. **Expert Review of Neurotherapeutics**, v. 13, n. 10, p. 1117-1128, Oct. 2013.

ASHWOOD, P. et al. Elevated plasma cytokines in autism spectrum disorders provide evidence of immune dysfunction and are associated with impaired behavioral outcome. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 25, n. 1, p. 40-45, Jan. 2011.

ASSOCIATION, A. P. **Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders**, 5th ed., [s.l.]: American Psychiatric Publishing, 2013. DSM-5TM.

BACCHELLI, E.; MAESTRINI, E. Autism spectrum disorders: molecular genetic advances. **American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics**, v. 142C, n. 1, p. 13-23, 15 Feb. 2006.

BALBUENA RIVERA, F. Breve revisión histórica del autismo. **Revista de la Asociación Española de Neuropsiquiatría**, v. 27, n. 2, p. 61-81, enero 2007.

BATTEY, J.; WADA, E.; WRAY, S. Bombesin receptor gene expression during mammalian development. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 739, p. 244-252, 31 Oct. 1994.

BATTEY, J. F. et al. Molecular cloning of the bombesin/gastrin-releasing peptide receptor from Swiss 3T3 cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, n. 2, p. 395-399, 15 Jan. 1991.

BAUMAN, M.; KEMPER, T. L. Histoanatomic observations of the brain in early infantile autism. **Neurology**, v. 35, n. 6, p. 866-874, June 1985.

BELGER, A. et al. The neural circuitry of autism. **Neurotoxicity Research**, v. 20, n. 3, p. 201-214, Oct. 2011.

BENVENUTO, A. et al. Pharmacotherapy of autism spectrum disorders. **Brain & Development**, v. 35, n. 2, p. 119-127, Feb. 2013.

BETANCUR, C. Etiological heterogeneity in autism spectrum disorders: more than 100 genetic and genomic disorders and still counting. **Brain Research**, v. 1380, p. 42-77, 22 Mar. 2011.

BRAMBILLA, P. et al. The functional neuroanatomy of autism. **Functional Neurology**, v. 19, n. 1, p. 9-17, Mar. 2004.

BRENTANI, H. et al. Autism spectrum disorders: an overview on diagnosis and treatment. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 35 Supl. 1, p. S62-72, 2013. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1516-444620130005000008&script=sci_arttext>. Acesso em: 19 set. 2015.

BUESCHER, A. V. S. et al. Costs of autism spectrum disorders in the United Kingdom and the United States. **JAMA Pediatrics**, v. 168, n. 8, p. 721-728, Aug. 2014.

BUIE, T. et al. Evaluation, diagnosis, and treatment of gastrointestinal disorders in individuals with ASDs: a consensus report. **Pediatrics**, v. 125 Suppl 1, p. S1-18, Jan. 2010.

Disponível em: <http://pediatrics.aappublications.org/content/125/Supplement_1/S1.full>. Acesso em: 19 set. 2015.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Prevalence of autism spectrum disorder among children aged 8 years - autism and developmental disabilities monitoring network, 11 sites, United States, 2010. **Morbidity and Mortality Weekly Report: Surveillance Summaries**, v. 63, n. 2, p. 1–21, 28 mar. 2014. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/ss6302a1.htm>>. Acesso em: 19 Sept. 2015.

CHAPERON, F. et al. Gastrin-releasing peptide signaling plays a limited and subtle role in amygdala physiology and aversive memory. **PloS One**, v. 7, n. 4, p. e34963, 2012.

CHEN, R.; JIAO, Y.; HERSKOVITS, E. H. Structural MRI in autism spectrum disorder. **Pediatric Research**, v. 69, n. 5 Pt 2, p. 63R-8R, May 2011.

CHUGANI, D. C. Neuroimaging and neurochemistry of autism. **Pediatric Clinics of North America**, v. 59, n. 1, p. 63-73, x, Feb. 2012.

CLIVE, S.; JODRELL, D.; WEBB, D. Gastrin-releasing peptide is a potent vasodilator in humans. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 69, n. 4, p. 252-259, Apr. 2001.

COHEN, D. et al. Specific genetic disorders and autism: clinical contribution towards their identification. **Journal of Autism and Developmental Disorders**, v. 35, n. 1, p. 103-116, Feb. 2005.

CORJAY, M. H. et al. Two distinct bombesin receptor subtypes are expressed and functional in human lung carcinoma cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 28, p. 18771-18779, 5 Oct. 1991.

COURCHESNE, E. et al. Unusual brain growth patterns in early life in patients with autistic disorder: an MRI study. **Neurology**, v. 57, n. 2, p. 245–254, 24 July 2001.

COURCHESNE, E. et al. Neuron number and size in prefrontal cortex of children with autism. **JAMA**, v. 306, n. 18, p. 2001-2010, 9 Nov. 2011.

CURRAN, M. P. Aripiprazole: in the treatment of irritability associated with autistic disorder in pediatric patients. **Paediatric Drugs**, v. 13, n. 3, p. 197-204, 1 June 2011.

D'MELLO, A. M. et al. Cerebellar gray matter and lobular volumes correlate with core autism symptoms. **Neuroimage: Clinical**, v. 7, p. 631-639, 2015.

EL ACHKAR, C. M.; SPENCE, S. J. Clinical characteristics of children and young adults with co-occurring autism spectrum disorder and epilepsy. **Epilepsy & Behavior: E&B**, 15 Jan. 2015.

ERSPAMER, V.; ERPAMER, G. F.; INSELVINI, M. Some pharmacological actions of alytesin and bombesin. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 22, n. 11, p. 875-876, Nov. 1970.

FILIPEK, P. A. et al. Practice parameter: screening and diagnosis of autism: report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology and the Child Neurology Society. **Neurology**, v. 55, n. 4, p. 468-479, 22 Aug. 2000.

FLOOD, J. F.; MORLEY, J. E. Effects of bombesin and gastrin-releasing peptide on memory processing. **Brain Research**, v. 460, n. 2, p. 314-322, 20 Set. 1988.

FLORES, D. G. et al. Gastrin-releasing peptide receptor content in human glioma and normal brain. **Brain Research Bulletin**, v. 82, n. 1-2, p. 95-98, 29 Apr. 2010.

GADIA, C. A.; TUCHMAN, R.; ROTTA, N. T. Autism and pervasive developmental disorders. **Jornal de Pediatria**, v. 80, n. 2, Supl. 0, p. S83-94, abr. 2004. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0021-75572004000300011&script=sci_arttext&tlng=en>. Acesso em: 19 set. 2015.

GANZ, J. B. et al. Meta-analysis of PECS with individuals with ASD: investigation of targeted versus non-targeted outcomes, participant characteristics, and implementation phase. **Research in Developmental Disabilities**, v. 33, n. 2, p. 406-418, Apr. 2012.

GARCIA, V. A. et al. Neonatal gastrin-releasing peptide receptor blockade reduces maternal odor preference in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 214, n. 2, p. 456-459, 25 Dec. 2010.

GARDENER, H.; SPIEGELMAN, D.; BUKA, S. L. Perinatal and neonatal risk factors for autism: a comprehensive meta-analysis. **Pediatrics**, v. 128, n. 2, p. 344-355, Aug. 2011.
Disponível em: <<http://pediatrics.aappublications.org/content/128/2/344.full>>. Acesso em: 19 set. 2015.

GARDENER, H.; SPIEGELMAN, D.; BUKA, S. L. Prenatal risk factors for autism: comprehensive meta-analysis. **The British Journal of Psychiatry: the Journal of Mental Science**, v. 195, n. 1, p. 7-14, July 2009.

GILLBERG, C. et al. Brief report: "the autism epidemic". The registered prevalence of autism in a Swedish urban area. **Journal of Autism and Developmental Disorders**, v. 36, n. 3, p. 429-435, abr. 2006.

GOLDANI, A. A. S. et al. Biomarkers in autism. **Frontiers in Psychiatry**, v. 5, p. 100, 2014.

GONZALEZ, N. et al. Bombesin-related peptides and their receptors: recent advances in their role in physiology and disease states. **Current Opinion in Endocrinology, Diabetes, and Obesity**, v. 15, n. 1, p. 58-64, Feb. 2008.

GREYDANUS, D. E.; TOLEDO-PEREYRA, L. H. Historical perspectives on autism: its past record of discovery and its present state of solipsism, skepticism, and sorrowful suspicion. **Pediatric Clinics of North America**, v. 59, n. 1, p. 1-11, ix, Feb. 2012.

GUÉNOLÉ, F. et al. Melatonin for disordered sleep in individuals with autism spectrum disorders: systematic review and discussion. **Sleep Medicine Reviews**, v. 15, n. 6, p. 379-387, Dec. 2011.

GUO, M.; QU, X.; QIN, X.-Q. Bombesin-like peptides and their receptors: recent findings in pharmacology and physiology. **Current Opinion in Endocrinology, Diabetes, and Obesity**, v. 22, n. 1, p. 3-8, Feb. 2015.

GUTZWILLER, J. P. et al. Effect of intravenous human gastrin-releasing peptide on food intake in humans. **Gastroenterology**, v. 106, n. 5, p. 1168-1173, May 1994.

HAPPÉ, F.; RONALD, A.; PLOMIN, R. Time to give up on a single explanation for autism. **Nature Neuroscience**, v. 9, n. 10, p. 1218-1220, Oct. 2006.

HARA, H. Autism and epilepsy: a retrospective follow-up study. **Brain & Development**, v. 29, n. 8, p. 486-490, Set. 2007.

HASHIMOTO, T. et al. Paroxysmal discharges on EEG in young autistic patients are frequent in frontal regions. **The journal of medical investigation: JMI**, v. 48, n. 3-4, p. 175–180, ago. 2001.

HEIDARY, G. et al. Exclusion of the gastrin-releasing peptide receptor (GRPR) locus as a candidate gene for Rett syndrome. **American Journal of Medical Genetics**, v. 78, n. 2, p. 173-175, 30 June 1998.

HERMES, M. L. H. J. et al. Gastrin-releasing peptide acts via postsynaptic BB2 receptors to modulate inward rectifier K⁺ and TRPV1-like conductances in rat paraventricular thalamic neurons. **The Journal of Physiology**, v. 591, n. 7, p. 1823-1839, 1 Apr. 2013.

HODGE, S. M. et al. Cerebellum, language, and cognition in autism and specific language impairment. **Journal of Autism and Developmental Disorders**, v. 40, n. 3, p. 300-316, Mar. 2010.

HOLLANDER, E. et al. A placebo controlled crossover trial of liquid fluoxetine on repetitive behaviors in childhood and adolescent autism. **Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 30, n. 3, p. 582-589, Mar. 2005.

HOWLIN, P. et al. Adult outcome for children with autism. **Journal of Child Psychology and Psychiatry, and Allied Disciplines**, v. 45, n. 2, p. 212-229, Feb. 2004.

HOWLIN, P.; MAWHOOD, L.; RUTTER, M. Autism and developmental receptive language disorder--a follow-up comparison in early adult life. II: Social, behavioural, and psychiatric outcomes. **Journal of Child Psychology and Psychiatry, and Allied Disciplines**, v. 41, n. 5, p. 561-578, July 2000.

ISHIKAWA-BRUSH, Y. et al. Autism and multiple exostoses associated with an X;8 translocation occurring within the GRPR gene and 3' to the SDC2 gene. **Human Molecular Genetics**, v. 6, n. 8, p. 1241-1250, Aug. 1997.

JAIN, A. et al. Autism occurrence by MMR vaccine status among US children with older siblings with and without autism. **JAMA**, v. 313, n. 15, p. 1534-1540, 21 Apr. 2015.

JENSEN, R. T. et al. International Union of Pharmacology. LXVIII. Mammalian bombesin receptors: nomenclature, distribution, pharmacology, signaling, and functions in normal and disease states. **Pharmacological Reviews**, v. 60, n. 1, p. 1-42, Mar. 2008.

JOHNSON, C. P.; MYERS, S. M. Identification and Evaluation of Children With Autism Spectrum Disorders. **Pediatrics**, v. 120, n. 5, p. 1183-1215, 11 Jan. 2007.

KAMICHI, S. et al. Immunohistochemical localization of gastrin-releasing peptide receptor in the mouse brain. **Brain Research**, v. 1032, n. 1-2, p. 162-170, 25 Jan. 2005.

KANNER, L. Autistic Disturbances of Affective Contact. **The Nervous Child**, v. 2, p. 217-51, 1942.

KAPLAN, G.; MCCRACKEN, J. T. Psychopharmacology of autism spectrum disorders. **Pediatric Clinics of North America**, v. 59, n. 1, p. 175-187, xii, fev. 2012.

KARST, J. S.; VAN HECKE, A. V. Parent and family impact of autism spectrum disorders: a review and proposed model for intervention evaluation. **Clinical Child and Family Psychology Review**, v. 15, n. 3, p. 247-277, Sept. 2012.

KIELINEN, M. et al. Associated Medical Disorders and Disabilities in Children with Autistic Disorder A Population-based Study. **Autism**, v. 8, n. 1, p. 49-60, 3 Jan. 2004.

KIM, J.; WIGRAM, T.; GOLD, C. The effects of improvisational music therapy on joint attention behaviors in autistic children: a randomized controlled study. **Journal of Autism and Developmental Disorders**, v. 38, n. 9, p. 1758-1766, Oct. 2008.

KING, B. H. et al. Update on diagnostic classification in autism. **Current Opinion in Psychiatry**, v. 27, n. 2, p. 105-109, Mar. 2014.

KLIN, A. Autism and Asperger syndrome: an overview. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 28 Supl. 1, p. S3–11, maio 2006. Disponível em:
<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-44462006000500002&lng=en&nrm=iso&tlng=en>. Acesso em: 19 set. 2015.

KOLVIN I. Infantile autism or infantile psychoses. **British Medical Journal**, v. 3, p. 753–55, 1972.

KONG, A. et al. Rate of de novo mutations and the importance of father's age to disease risk. **Nature**, v. 488, n. 7412, p. 471-475, 23 Aug. 2012.

KOSAKA, H. et al. Smaller insula and inferior frontal volumes in young adults with pervasive developmental disorders. **Neuroimage**, v. 50, n. 4, p. 1357-1363, 1 May 2010.

LAM, K. S. L.; AMAN, M. G.; ARNOLD, L. E. Neurochemical correlates of autistic disorder: a review of the literature. **Research in Developmental Disabilities**, v. 27, n. 3, p. 254-289, June 2006.

LEVY, S. E.; MANDELL, D. S.; SCHULTZ, R. T. Autism. **Lancet**, v. 374, n. 9701, p. 1627-1638, 7 Nov. 2009.

LEYFER, O. T. et al. Comorbid psychiatric disorders in children with autism: interview development and rates of disorders. **Journal of Autism and Developmental Disorders**, v. 36, n. 7, p. 849-861, Oct. 2006.

LIU, Q.-Q. et al. [Spinal gastrin-releasing peptide system mediates sexual function of males: advances in studies]. **Zhonghua Nan Ke Xue = National Journal of Andrology**, v. 20, n. 6, p. 554-557, June 2014.

LOSAPIO, M. F. et al. Adaptação transcultural parcial da escala Aberrant Behavior Checklist (ABC), para avaliar eficácia de tratamento em pacientes com retardo mental. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 27, n. 5, p. 909-923, maio 2011. Disponível em:

<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-311X2011000500009>.

Acesso em: 19 set 2015.

LUFT, T. et al. A role for hippocampal gastrin-releasing peptide receptors in extinction of aversive memory. **Neuroreport**, v. 17, n. 9, p. 935-939, 26 June 2006.

MAGLIONE, M. A. et al. Nonmedical interventions for children with ASD: recommended guidelines and further research needs. **Pediatrics**, v. 130, Suppl. 2, p. S169-178, Nov. 2012.

Disponível em:

<http://pediatrics.aappublications.org/content/130/Supplement_2/S169.abstract>. Acesso em: 19 set. 2015.

MARCUS, R. N. et al. A placebo-controlled, fixed-dose study of aripiprazole in children and adolescents with irritability associated with autistic disorder. **Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry**, v. 48, n. 11, p. 1110-1119, Nov. 2009.

MARUI, T. et al. Gastrin-releasing peptide receptor (GRPR) locus in Japanese subjects with autism. **Brain & Development**, v. 26, n. 1, p. 5-7, Jan. 2004.

MATSUO, M. et al. Frequent association of autism spectrum disorder in patients with childhood onset epilepsy. **Brain & Development**, v. 32, n. 9, p. 759-763, Oct. 2010.

MAZZONE, L. et al. Catatonia in patients with autism: prevalence and management. **CNS Drugs**, v. 28, n. 3, p. 205-215, Mar. 2014.

MAZZONE, L.; RUTA, L.; REALE, L. Psychiatric comorbidities in asperger syndrome and high functioning autism: diagnostic challenges. **Annals of General Psychiatry**, v. 11, n. 1, p. 16, 2012.

MCBRIDE, K. L. et al. Confirmation study of PTEN mutations among individuals with autism or developmental delays/mental retardation and macrocephaly. **Autism Research: Official Journal of the International Society for Autism Research**, v. 3, n. 3, p. 137-141, June 2010.

MCCRACKEN, J. T. et al. Risperidone in children with autism and serious behavioral problems. **The New England Journal of Medicine**, v. 347, n. 5, p. 314-321, 1 Aug. 2002. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa013171>>. Acesso em: 19 set. 2015.

MCDONALD, T. J. et al. Characterization of a gastrin releasing peptide from porcine non-antral gastric tissue. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 90, n. 1, p. 227-233, 12 Sept. 1979.

MCELHANON, B. O. et al. Gastrointestinal symptoms in autism spectrum disorder: a meta-analysis. **Pediatrics**, v. 133, n. 5, p. 872-883, May 2014. Disponível em: <<http://pediatrics.aappublications.org/content/133/5/872.abstract>>. Acesso em: 19 set. 2015.

MEFFORD, H. C.; BATSHAW, M. L.; HOFFMAN, E. P. Genomics, intellectual disability, and autism. **The New England Journal of Medicine**, v. 366, n. 8, p. 733-743, 23 Feb. 2012.

MERALI, Z. et al. Long-term behavioral effects of neonatal blockade of gastrin-releasing peptide receptors in rats: similarities to autism spectrum disorders. **Behavioural Brain Research**, v. 263, p. 60-69, 15 Apr. 2014.

MILES, J. H. Autism spectrum disorders--a genetics review. **Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics**, v. 13, n. 4, p. 278-294, Apr. 2011.

MILES, J. H.; HILLMAN, R. E. Value of a clinical morphology examination in autism. **American Journal of Medical Genetics**, v. 91, n. 4, p. 245-253, 10 Apr. 2000.

MILLER, D. T. et al. Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies.

American Journal of Human Genetics, v. 86, n. 5, p. 749-764, 14 May 2010.

MINAMINO, N.; KANGAWA, K.; MATSUO, H. Neuromedin B: a novel bombesin-like peptide identified in porcine spinal cord. **Biochemical and Biophysical Research**

Communications, v. 114, n. 2, p. 541-548, 29 July 1983.

MINSHEW, N. J.; WILLIAMS, D. L. The new neurobiology of autism: cortex, connectivity, and neuronal organization. **Archives of Neurology**, v. 64, n. 7, p. 945-950, July 2007.

MIRAL, S. et al. Risperidone versus haloperidol in children and adolescents with AD : a randomized, controlled, double-blind trial. **European Child & Adolescent Psychiatry**, v. 17, n. 1, p. 1-8, Feb. 2008.

MOODY, T. W.; MERALI, Z. Bombesin-like peptides and associated receptors within the brain: distribution and behavioral implications. **Peptides**, v. 25, n. 3, p. 511-520, Mar. 2004.

MOREIRA, D. P. et al. Investigation of 15q11-q13, 16p11.2 and 22q13 CNVs in autism spectrum disorder Brazilian individuals with and without epilepsy. **PloS One**, v. 9, n. 9, p. e107705, 2014.

MORGAN, J. T. et al. Stereological study of amygdala glial populations in adolescents and adults with autism spectrum disorder. **PloS One**, v. 9, n. 10, p. e110356, 2014.

MORI, K. et al. Neuroimaging in autism spectrum disorders: (1)H-MRS and NIRS study. **The journal of medical investigation: JMI**, v. 62, n. 1-2, p. 29-36, 2015.

MUHLE, R.; TRENTACOSTE, S. V.; RAPIN, I. The genetics of autism. **Pediatrics**, v. 113, n. 5, p. e472-486, May 2004. Disponível em:

<<http://pediatrics.aappublications.org/content/113/5/e472.long>>. Acesso em: 19 set. 2015.

- MURRAY, M. J. Attention-deficit/Hyperactivity Disorder in the context of Autism spectrum disorders. **Current Psychiatry Reports**, v. 12, n. 5, p. 382-388, Oct. 2010.
- MYERS, S. M.; JOHNSON, C. P. Management of Children With Autism Spectrum Disorders. **Pediatrics**, v. 120, n. 5, p. 1162-1182, Nov. 2007. Disponível em: <<http://pediatrics.aappublications.org/content/120/5/1162.full>>. Acesso em: 19 set. 2015.
- NAZEER, A. Psychopharmacology of autistic spectrum disorders in children and adolescents. **Pediatric Clinics of North America**, v. 58, n. 1, p. 85-97, x, Feb. 2011.
- NAZEER, A.; GHAZIUDDIN, M. Autism spectrum disorders: clinical features and diagnosis. **Pediatric Clinics of North America**, v. 59, n. 1, p. 19-25, ix, Feb. 2012.
- NELSON, K. B. et al. Neuropeptides and neurotrophins in neonatal blood of children with autism or mental retardation. **Annals of Neurology**, v. 49, n. 5, p. 597-606, May 2001.
- OLIVIÉ, H. The medical care of children with autism. **European Journal of Pediatrics**, v. 171, n. 5, p. 741-749, May 2012.
- OWEN, R. et al. Aripiprazole in the treatment of irritability in children and adolescents with autistic disorder. **Pediatrics**, v. 124, n. 6, p. 1533-1540, Dec. 2009. Disponível em: <<http://pediatrics.aappublications.org/content/124/6/1533.long>>. Acesso em: 19 set. 2015.
- PARELLADA, M. et al. The neurobiology of autism spectrum disorders. **European Psychiatry: the Journal of the Association of European Psychiatrists**, v. 29, n. 1, p. 11-19, Jan. 2014.
- PAULA, C. S. et al. Brief report: prevalence of pervasive developmental disorder in Brazil: a pilot study. **Journal of Autism and Developmental Disorders**, v. 41, n. 12, p. 1738-1742, Dec. 2011.
- PIVEN, J. et al. An MRI study of brain size in autism. **The American Journal of Psychiatry**, v. 152, n. 8, p. 1145-1149, Aug. 1995.

PIVEN, J. et al. An MRI study of the corpus callosum in autism. **The American Journal of Psychiatry**, v. 154, n. 8, p. 1051–1056, Aug. 1997.

POLITTE, L. C.; HENRY, C. A.; MCDUGLE, C. J. Psychopharmacological interventions in autism spectrum disorder. **Harvard Review of Psychiatry**, v. 22, n. 2, p. 76-92, Apr. 2014.

POSADA-DE LA PAZ, M. et al. Investigación epidemiológica en el autismo: una visión integradora. **Revista de Neurología**, v. 40 Supl. 1, p. S191-198, 15 enero 2005. Disponível em: <<http://www.neurologia.com/pdf/Web/40S1/sS1S191.pdf>>. Acesso em: 19 set. 2015.

PRESTI-TORRES, J. et al. Impairments of social behavior and memory after neonatal gastrin-releasing peptide receptor blockade in rats: Implications for an animal model of neurodevelopmental disorders. **Neuropharmacology**, v. 52, n. 3, p. 724-732, Mar. 2007.

PRESTI-TORRES, J. et al. Rescue of social behavior impairment by clozapine and alterations in the expression of neuronal receptors in a rat model of neurodevelopmental impairment induced by GRPR blockade. **Journal of Neural Transmission**, v. 119, n. 3, p. 319-327, Mar. 2012.

RAO, P. N. et al. Molecular cytogenetic analysis of a duplication Xp in a male: further delineation of a possible sex influencing region on the X chromosome. **Human Genetics**, v. 94, n. 2, p. 149-153, Aug. 1994.

RASHIDY-POUR, A.; RAZVANI, M. E. Unilateral reversible inactivations of the nucleus tractus solitarius and amygdala attenuate the effects of bombesin on memory storage. **Brain Research**, v. 814, n. 1-2, p. 127-132, 14 Dec. 1998.

REDCAY, E.; COURCHESNE, E. When is the brain enlarged in autism? A meta-analysis of all brain size reports. **Biological Psychiatry**, v. 58, n. 1, p. 1-9, 1 July 2005.

REZAEI, V. et al. Double-blind, placebo-controlled trial of risperidone plus topiramate in children with autistic disorder. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 34, n. 7, p. 1269-1272, 1 Oct. 2010.

ROESLER, R. et al. Bombesin/gastrin-releasing peptide receptors in the basolateral amygdala regulate memory consolidation. **The European Journal of Neuroscience**, v. 19, n. 4, p. 1041-1045, Feb. 2004a.

ROESLER, R. et al. Intrahippocampal infusion of the bombesin/gastrin-releasing peptide antagonist RC-3095 impairs inhibitory avoidance retention. **Peptides**, v. 24, n. 7, p. 1069-1074, July 2003.

ROESLER, R. et al. Gastrin-releasing peptide receptor signaling in the integration of stress and memory. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 112, p. 44-52, July 2014.

ROESLER, R. et al. Molecular mechanisms mediating gastrin-releasing peptide receptor modulation of memory consolidation in the hippocampus. **Neuropharmacology**, v. 51, n. 2, p. 350-357, Aug. 2006.

ROESLER, R. et al. RC-3095, a bombesin/gastrin-releasing peptide receptor antagonist, impairs aversive but not recognition memory in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 486, n. 1, p. 35-41, 13 Feb. 2004b.

ROESLER, R.; HENRIQUES, J. A. P.; SCHWARTSMANN, G. Gastrin-releasing peptide receptor as a molecular target for psychiatric and neurological disorders. **CNS & Neurological Disorders Drug Targets**, v. 5, n. 2, p. 197-204, Apr. 2006.

ROESLER, R.; SCHWARTSMANN, G. Gastrin-releasing peptide receptors in the central nervous system: role in brain function and as a drug target. **Frontiers in Endocrinology**, v. 3, p. 159, 2012.

ROSSIGNOL, D. A. Novel and emerging treatments for autism spectrum disorders: a systematic review. **Annals of Clinical Psychiatry: Official Journal of the American Academy of Clinical Psychiatrists**, v. 21, n. 4, p. 213-236, Dec. 2009.

RUTISHAUSER, U.; MAMELAK, A. N.; ADOLPHS, R. The primate amygdala in social perception - insights from electrophysiological recordings and stimulation. **Trends in Neurosciences**, v. 38, n. 5, p. 295-306, May 2015. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166223615000600>>. Acesso em: 19 set. 2015.

RUTTER, M. Childhood schizophrenia reconsidered. **Journal Autism Childhood Schizophrenia**, v. 2, p.315–337, 1972.

RUTTER, M. L. Progress in understanding autism: 2007-2010. **Journal of Autism and Developmental Disorders**, v. 41, n. 4, p. 395-404, Apr. 2011.

RYBAKOWSKI, F. et al. [Autism spectrum disorders - epidemiology, symptoms, comorbidity and diagnosis]. **Psychiatria Polska**, v. 48, n. 4, p. 653-665, Aug. 2014.

SAKAMOTO, H. et al. Sexually dimorphic gastrin releasing peptide system in the spinal cord controls male reproductive functions. **Nature Neuroscience**, v. 11, n. 6, p. 634-636, June 2008.

SANDIN, S. et al. Advancing maternal age is associated with increasing risk for autism: a review and meta-analysis. **Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry**, v. 51, n. 5, p. 477-486.e1, May 2012.

SANTO-YAMADA, Y.; YAMADA, K.; WADA, K. Posttraining administration of gastrin-releasing peptide improves memory loss in scopolamine- and hypoxia-induced amnesic mice. **Physiology & Behavior**, v. 74, n. 1-2, p. 139-143, 1 Sept. 2001.

SCHAAFSMA, S. M.; PFAFF, D. W. Etiologies underlying sex differences in Autism Spectrum Disorders. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 35, n. 3, p. 255-271, Aug. 2014.

SCHAEFER, G. B.; MENDELSON, N. J.; PROFESSIONAL PRACTICE AND GUIDELINES COMMITTEE. Clinical genetics evaluation in identifying the etiology of autism spectrum disorders: 2013 guideline revisions. **Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics**, v. 15, n. 5, p. 399-407, May 2013.

SCHAIN, R. J.; FREEDMAN, D. X. Studies on 5-hydroxyindole metabolism in autistic and other mentally retarded children. **The Journal of Pediatrics**, v. 58, p. 315-320, Mar. 1961.

SCHUMANN, C. M. et al. The amygdala is enlarged in children but not adolescents with autism; the hippocampus is enlarged at all ages. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 24, n. 28, p. 6392-6401, 14 July 2004.

SCHUMANN, C. M. et al. Amygdala enlargement in toddlers with autism related to severity of social and communication impairments. **Biological Psychiatry**, v. 66, n. 10, p. 942-949, 15 Nov. 2009.

SCHUMANN, C. M.; AMARAL, D. G. Stereological analysis of amygdala neuron number in autism. **The Journal of Neuroscience: the Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 26, n. 29, p. 7674-7679, 19 July 2006.

SEBAT, J. et al. Strong association of de novo copy number mutations with autism. **Science**, v. 316, n. 5823, p. 445-449, 20 Apr. 2007.

SEIDITA, G. et al. Analysis of the gastrin-releasing peptide receptor gene in Italian patients with autism spectrum disorders. **American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics: the Official Publication of the International Society of Psychiatric Genetics**, v. 147B, n. 6, p. 807-813, 5 Sept. 2008.

SHAKIBA, A. The role of the cerebellum in neurobiology of psychiatric disorders. **Neurologic Clinics**, v. 32, n. 4, p. 1105-1115, Nov. 2014.

SHISHIDO, E.; ALEKSIC, B.; OZAKI, N. Copy-number variation in the pathogenesis of autism spectrum disorder. **Psychiatry and Clinical Neurosciences**, v. 68, n. 2, p. 85-95, Feb. 2014.

SHUMYATSKY, G. P. et al. Identification of a signaling network in lateral nucleus of amygdala important for inhibiting memory specifically related to learned fear. **Cell**, v. 111, n. 6, p. 905-918, 13 Dec. 2002.

SILVER, W. G.; RAPIN, I. Neurobiological basis of autism. **Pediatric Clinics of North America**, v. 59, n. 1, p. 45-61, x, Feb. 2012.

SIMONOFF, E. Autism spectrum disorder: prevalence and cause may be bound together. **The British Journal of Psychiatry: the Journal of Mental Science**, v. 201, p. 88-89, Aug. 2012.

SIVERTSEN, B. et al. Sleep problems in children with autism spectrum problems: a longitudinal population-based study. **Autism**, v. 16, n. 2, p. 139-150, 1 Mar. 2012.

SKOKAUSKAS, N.; GALLAGHER, L. Psychosis, affective disorders and anxiety in autistic spectrum disorder: prevalence and nosological considerations. **Psychopathology**, v. 43, n. 1, p. 8-16, 2010.

SMITH, L. E.; GREENBERG, J. S.; MAILICK, M. R. The family context of autism spectrum disorders: influence on the behavioral phenotype and quality of life. **Child and Adolescent Psychiatric Clinics of North America**, v. 23, n. 1, p. 143-155, Jan. 2014.

STANFIELD, A. C. et al. Towards a neuroanatomy of autism: a systematic review and meta-analysis of structural magnetic resonance imaging studies. **European Psychiatry: the Journal of the Association of European Psychiatrists**, v. 23, n. 4, p. 289-299, June 2008.

STANKOVIĆ, M.; LAKIĆ, A.; ILIĆ, N. Autism and autistic spectrum disorders in the context of new DSM-V classification, and clinical and epidemiological data. **Srpski Arhiv Za Celokupno Lekarstvo**, v. 140, n. 3-4, p. 236-243, Apr. 2012.

STIGLER, K. A. et al. Structural and functional magnetic resonance imaging of autism spectrum disorders. **Brain Research**, v. 1380, p. 146-161, 22 Mar. 2011.

STONER, R. et al. Patches of disorganization in the neocortex of children with autism. **The New England Journal of Medicine**, v. 370, n. 13, p. 1209-1219, 27 Mar. 2014. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa1307491>>. Acesso em: 19 set. 2015.

SUN, Y.-G.; CHEN, Z.-F. A gastrin-releasing peptide receptor mediates the itch sensation in the spinal cord. **Nature**, v. 448, n. 7154, p. 700-703, 9 Aug. 2007.

TCHACONAS, A.; ADESMAN, A. Autism spectrum disorders: a pediatric overview and update. **Current Opinion in Pediatrics**, v. 25, n. 1, p. 130-144, Feb. 2013.

TORIELLO, H. V. Approach to the genetic evaluation of the child with autism. **Pediatric Clinics of North America**, v. 59, n. 1, p. 113-128, xi, Feb. 2012.

TURECK, K. et al. An examination of the relationship between autism spectrum disorder, intellectual functioning, and comorbid symptoms in children. **Research in Developmental Disabilities**, v. 35, n. 7, p. 1766-1772, July 2014.

VERHOEFF, B. Autism in flux: a history of the concept from Leo Kanner to DSM-5. **History of Psychiatry**, v. 24, n. 4, p. 442-458, Dec. 2013.

VERHOEVEN, J. S. et al. Neuroimaging of autism. **Neuroradiology**, v. 52, n. 1, p. 3-14, Jan. 2010.

VIRUES-ORTEGA, J.; JULIO, F. M.; PASTOR-BARRIUSO, R. The TEACCH program for children and adults with autism: a meta-analysis of intervention studies. **Clinical Psychology Review**, v. 33, n. 8, p. 940-953, Dec. 2013.

VOLKMAR, F. R.; MCPARTLAND, J. C. From Kanner to DSM-5: autism as an evolving diagnostic concept. **Annual Review of Clinical Psychology**, v. 10, p. 193-212, 2014.

WALSH, K. M.; BRACKEN, M. B. Copy number variation in the dosage-sensitive 16p11.2 interval accounts for only a small proportion of autism incidence: a systematic review and meta-analysis. **Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics**, v. 13, n. 5, p. 377-384, May 2011.

WARREN, Z. et al. A systematic review of early intensive intervention for autism spectrum disorders. **Pediatrics**, v. 127, n. 5, p. e1303-1311, May 2011. Disponível em: <<http://pediatrics.aappublications.org/content/127/5/e1303.full>>. Acesso em: 19 set. 2015.

WEBER, H. C. Regulation and signaling of human bombesin receptors and their biological effects. **Current Opinion in Endocrinology, Diabetes, and Obesity**, v. 16, n. 1, p. 66-71, Feb. 2009.

WEBER, H. C. Gastrointestinal peptides and itch sensation. **Current Opinion in Endocrinology, Diabetes, and Obesity**, v. 22, n. 1, p. 29-33, Feb. 2015.

WEISS, J. A. et al. The impact of child problem behaviors of children with ASD on parent mental health: the mediating role of acceptance and empowerment. **Autism: the International Journal of Research and Practice**, v. 16, n. 3, p. 261-274, May 2012.

WEISSMAN, J. R. et al. Mitochondrial disease in autism spectrum disorder patients: a cohort analysis. **PloS One**, v. 3, n. 11, p. e3815, 2008.

WILLIAMS, C. L.; MCGAUGH, J. L. Enhancement of memory processing in an inhibitory avoidance and radial maze task by post-training infusion of bombesin into the nucleus tractus solitarius. **Brain Research**, v. 654, n. 2, p. 251-256, 22 Aug. 1994.

WILLIAMS, K. et al. Selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) for autism spectrum disorders (ASD). **The Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 8, n. CD004677, 2013.

WILLIAMS, K. et al. Autism in context 1: Classification, counting and causes. **Journal of Paediatrics and Child Health**, v. 50, n. 5, p. 335-340, May 2014.

WILLIAMS, K.; WRAY, J. A.; WHEELER, D. M. Intravenous secretin for autism spectrum disorders (ASD). **The Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 4, n. CD003495, 2012.

WILLSEY, A. J.; STATE, M. W. Autism spectrum disorders: from genes to neurobiology. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 30, p. 92-99, Feb. 2015.

WING, L. Asperger's syndrome: a clinical account. **Psychological Medicine**, v. 11, n. 1, p. 115-129, Feb. 1981.

XIAO, D. et al. The human gastrin-releasing peptide receptor gene structure, its tissue expression and promoter. **Gene**, v. 264, n. 1, p. 95-103, 7 Feb. 2001.

YOUNG, N.; FINDLING, R. L. An update on pharmacotherapy for autism spectrum disorder in children and adolescents. **Current Opinion in Psychiatry**, v. 28, n. 2, p. 91-101, Mar. 2015.

ZILBOVICIUS, M.; MERESSE, I.; BODDAERT, N. Autism: neuroimaging. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 28 Supl. 1, p. S21-28, maio 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-44462006000500004&lng=en&nrm=iso&tlng=en>. Acesso em: 19 set. 2015.

8 ARTIGO

USO DO PEPTÍDEO LIBERADOR DE GASTRINA EM CRIANÇAS COM DIAGNÓSTICO DE AUTISMO. ESTUDO *CROSSOVER*, RANDOMIZADO E CONTROLADO POR PLACEBO.

Marchezan J¹, Schwartsmann G², Becker MM³, Roesler R⁴, Ohlweiler L³, Riesgo RS⁵

RESUMO

Objetivos: Comparar a eficácia, segurança, tolerabilidade do GRP em relação ao placebo em sintomas do TEA. **Metodologia:** Ensaio clínico *crossover*, randomizado, duplo-cego, controlado por placebo, com uso de GRP 160 picomol/kg por 4 dias consecutivos, em 10 crianças com autismo. Os desfechos foram medidos através da escala *Aberrant Behavior Checklist* (ABC). **Resultados:** Todos os participantes eram do sexo masculino, com idade entre 4 e 9 anos. Houve uma redução nos escores da escala ABC e suas subescalas após o uso de GRP e de placebo. Apesar dessa redução ser mais proeminente com o GRP, principalmente nas subescalas Irritabilidade, Comportamento estereotipado e Hiperatividade, não houve diferença estatística entre os resultados (p 0,334). Após uma semana da infusão, 5 crianças apresentavam melhora maior que 25% no escore total da escala ABC com uso de GRP e 2 com uso de placebo, não apresentando diferença estatística (p 0,375). Não houve efeitos adversos, alterações dos sinais vitais ou variações laboratoriais associados ao uso de GRP em nenhum paciente. **Conclusões:** Os resultados deste estudo, apesar do tamanho reduzido da amostra, reforçam os dados anteriores sobre a segurança do GRP no uso a curto prazo. Apesar de ter ocorrido redução dos escores da escala ABC após uso de GRP, não houve diferença estatística em relação ao placebo. Devido ao desenho *crossover* e tamanho pequeno da amostra do estudo atual, não foi possível esclarecer a real eficácia do GRP na redução dos sintomas do TEA na infância. Existe a necessidade de novas pesquisas com outros delineamentos e tamanho amostral maior para confirmar a eficácia e segurança do GRP em crianças com autismo.

Palavras-chave: Peptídeo liberador de gastrina. Peptídeos bombesina. Neuropeptídeos. Transtornos do neurodesenvolvimento. Autismo. Transtorno do espectro autista.

¹Médico Neurologista Infantil, aluno do Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente da UFRGS, MD.

²Professor de Oncologia da UFRGS, Chefe do Serviço de Oncologia do HCPA, Ph.D.

³Médica Neurologista Infantil do HCPA, Ph.D.

⁴Professor do Departamento de Farmacologia da UFRGS, Ph.D.

⁵Professor de Pediatria e do Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente da UFRGS. Chefe da Unidade de Neurologia Infantil do HCPA, Ph.D.

ABSTRACT

Objectives: To compare the efficacy, safety, tolerability GRP compared to placebo in ASD symptoms. **Methodology:** crossover clinical trial, randomized, double-blind, placebo-controlled, using GRP 160 picomol/kg for 4 consecutive days in 10 children with autism. Outcomes were measured by the Aberrant Behavior Checklist scale (ABC). **Results:** All participants were male, aged between 4 and 9 years. There was a reduction in the scores of the ABC range and its subscales after use GRP and placebo. Despite this reduction be more prominent with the GRP, particularly in subscales Irritability, Stereotypic behavior and Hyperactivity and noncompliance, there was no statistical difference between the results (p 0.334). After a week of infusion, 5 children showed improvement greater than 25% in the total score of the ABC scale in GRP use and 2 with placebo use, however there was no statistical difference (p 0.375). No adverse effects, changes in vital signs or laboratory abnormalities associated with use of GRP in any patient. **Conclusions:** The results of this study, despite the small sample size, reinforce previous data on the safety of the GRP in the short-term use. Although there was a reduction in ABC scale scores after use of GRP, there was no statistical difference from placebo. Due to the small sample size and design of the current study, it was not possible to clarify the real effectiveness of GRP in reducing the symptoms of ASD in childhood. There is a need for further research with other designs and larger sample size to confirm the efficacy and safety of GRP in children with autism.

Keywords: Gastrin-releasing peptide receptor. Bombesin-like peptides. Neuropeptides. Neurodevelopmental disorders. Autism. Autism spectrum disorder.

Introdução

Os neuropeptídeos regulam uma variedade de aspectos da função nervosa e neuroendócrina, atuando através da ativação de receptores específicos da membrana celular (ROESLER; SCHWARTSMANN, 2012). No sistema nervoso central (SNC) os receptores do peptídeo liberador de gastrina (GRPR) são amplamente expressos, e numerosos efeitos centrais têm sido descritos com a sua ativação, incluindo efeitos sobre a saciedade, regulação do ritmo circadiano, termorregulação, modulação do stress, resposta ao medo, ansiedade e memória. (GONZALEZ et al., 2008; GUO; QU; QIN, 2015; LIU et al., 2014; MOODY; MERALI, 2004; ROESLER et al., 2014; ROESLER; HENRIQUES; SCHWARTSMANN,

2006; ROESLER; SCHWARTSMANN, 2012; SAKAMOTO et al., 2008; SUN; CHEN, 2007; WEBER, 2009, 2015). Pesquisas mostraram que o bloqueio farmacológico do GRPR em modelos animais leva ao surgimento de déficits da interação social, padrões restritivos de comportamento e estereotipias motoras, sintomas semelhantes ao comportamento autista em humanos, sugerindo a possibilidade de que o complexo GRP/GRPR possa ter um papel na patogênese do transtorno do espectro autista (TEA) (GARCIA et al., 2010; MERALI et al., 2014; PRESTI-TORRES et al., 2007, 2012; ROESLER; SCHWARTSMANN, 2012).

O peptídeo liberador de gastrina (GRP) foi administrado a crianças autistas em dois estudos prévios (em submissão). No primeiro trabalho, 3 crianças receberam 160 picomol/kg durante 4 dias consecutivos. Todos os três pacientes apresentaram graus variáveis de melhora nos sintomas do espectro, com boa tolerância e sem efeitos adversos. No segundo *Trial*, com metodologia semelhante ao anterior, seis (60%) dos 10 participantes tiveram melhora com o GRP, considerada como valores de 1 (muito melhor) ou 2 (melhor) na *Clinical Global Impression-Improvement Scale* (CGI-I) e melhora $\geq 25\%$ em pelo menos uma das subescalas da ABC. Pela escala ABC, 80% tiveram melhora nas subescalas Irritabilidade e Hiperatividade, 70% nas subescalas Comportamento estereotipado e Letargia e Esquiva social e 40% na subescala Fala inapropriada. Na *Childhood Autism Rating Scale* (CARS), houve uma diminuição média de 4 pontos e na *Diagnostic Interview-Revised* (ADI-R) houve melhora significativa no domínio de interação social recíproca, com uma redução média de 2,4 pontos após GRP. Não houve registro de efeitos adversos graves, mas três pacientes apresentaram náuseas, vômitos, diarreia e *rash* cutâneo, em leve intensidade. A duração dos efeitos do GRP foi de até duas semanas na maioria dos pacientes, conforme descrição dos pais e/ou cuidadores.

No presente estudo foi administrado GRP endovenoso e placebo a crianças com TEA para avaliação de possíveis efeitos terapêuticos nos sintomas do espectro, além da sua tolerabilidade e segurança.

Métodos

Participantes

Foram incluídas no estudo 10 crianças com diagnóstico de autismo infantil pelos critérios do Manual Diagnóstico e Estatístico de Doenças Mentais, 5ª edição (ASSOCIATION, 2013) com idade entre 3 e 9 anos, tomografia computadorizada ou ressonância magnética de encéfalo normal e investigação genética com cariótipo e pesquisa de X-Frágil normais. Foram excluídas do estudo crianças que apresentavam condições associadas ao aumento da secreção ácida no sistema gastrointestinal (ex. gastrite, úlcera gástrica, úlcera duodenal, esofagite de refluxo), diabetes ou cardiopatia, que residissem fora da região metropolitana de Porto Alegre e que tivessem autismo secundário. Medicamentos psicotrópicos eram permitidos desde que estivessem com as doses estáveis por ≥ 4 semanas antes do início do estudo e fossem mantidos estáveis durante toda a pesquisa.

A pesquisa foi divulgada no ambulatório de TEA do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA por meio de cartazes e em meio de comunicação (jornal de grande circulação). Os voluntários receberam um termo de esclarecimento e uma ficha que deveria ser preenchida pelo médico assistente e entregue aos pesquisadores caso houvesse interesse em participar da pesquisa. A seleção seguiu a ordem de entrega das fichas, incluindo no estudo os 10 primeiros voluntários em acordo com os critérios de seleção.

Delineamento do Estudo

Ensaio clínico, do tipo *crossover*, monocêntrico, randomizado, duplo cego com sujeitos pediátricos com diagnóstico de autismo.

Intervenção

Os pacientes foram submetidos a infusões endovenosas de GRP na dose de 160 picomol/kg ou soro fisiológico (placebo), uma vez ao dia, por 4 dias consecutivos, com intervalo de 3 semanas entre as aplicações. Todos os pacientes receberam GRP e placebo.

O GRP humano utilizado no estudo foi sintetizado pela empresa *Sigma-Aldrich Co*, de *Saint Louis, Missouri, USA*, e apresenta níveis de pureza adequados para ensaios clínicos.

Local de realização

As infusões foram realizadas em leitos da sala de infusões do Centro de Pesquisas Clínicas do HCPA. A aplicação dos instrumentos de avaliação e os encontros de seguimento com os pais e ou responsáveis foram realizados no ambulatório do HCPA.

Logística

Duas semanas antes do início das infusões os pacientes começavam o uso oral de omeprazol 2mg/kg/dia. O uso dessa medicação objetivou reduzir o efeito do GRP na liberação de gastrina e o risco de efeitos adversos secundários ao aumento da secreção de ácidos no trato gastrointestinal. Esse era mantido até o término das avaliações.

Os sujeitos foram divididos em 2 braços de tratamento (A e B), cada braço com 5 sujeitos, randomizados na proporção 1:1. A randomização foi feita por método simples, através de sorteio. Na primeira parte da pesquisa o grupo A recebeu infusão de GRP enquanto

o grupo B recebeu placebo. Após três semanas, o grupo B recebeu infusão de GRP e o grupo A placebo.

As bolsas contendo GRP e soro fisiológico (placebo) eram idênticas em volume e aspecto. Os pais e/ou responsáveis, os médicos e a equipe de enfermagem que participou diretamente da pesquisa eram cegos quanto à substância que estava sendo infundida.

As infusões eram realizadas em 30 minutos, ficando o paciente em observação quanto ao surgimento de possíveis efeitos colaterais por 1 hora após o seu término. Durante esse período, o paciente era acompanhado por um dos médicos pesquisadores com monitoramento dos sinais vitais e de possíveis efeitos colaterais. Após, o paciente e sua família eram liberados e estimulados a seguirem sua rotina diária habitual.

Para melhor avaliar os efeitos adversos da administração do GRP, foram coletadas 4 amostras de sangue por criança. Uma amostra imediatamente antes da primeira infusão (GRP ou placebo) e outra antes da infusão do quarto dia. Nessas amostras foram realizadas as seguintes análises: hemograma com plaquetas, transaminase glutâmica oxalacética (TGO), transaminase glutâmica pirúvica (TGP), amilase, bilirrubina total e frações, gama glutamil transpeptidase (gama-GT), glicose, uréia e creatinina.

Os sintomas do espectro autista foram avaliados através da escala ABC pré-infusão e uma semana pós-infusão de GRP e placebo (Figura 1). Para minimizar possível viés, o pesquisador responsável pela aplicação das escalas era cego quanto à alocação no tratamento.

Instrumentos de avaliação

Para avaliação dos resultados foi utilizada a escala ABC previamente utilizada em *trials* com antipsicóticos em autismo (MARCUS et al., 2009; OWEN et al., 2009; RESEARCH UNITS ON PEDIATRIC PSYCHOPHARMACOLOGY AUTISM NETWORK, 2005). Essa escala pode ser usada para avaliar o efeito de intervenções terapêuticas em indivíduos com deficiência mental. É composta por 58 itens, divididos em 5 subescalas (I-Irritabilidade,

Agitação e Choro; II- Letargia e Esquiva social; III- Comportamento estereotipado; IV- Hiperatividade; V- Fala inapropriada). Para cada item há as opções de pontuação: 0- não é problema; 1- o comportamento é um problema, mas em grau leve; 2- o problema tem gravidade moderada; 3- o problema é grave (AMAN et al., 1985; KAAT; LECAVALIER; AMAN, 2014; LOSAPIO et al., 2011).

Considerações éticas

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA (registro no Grupo de Pesquisas do HCPA 14-0011). Os pais e/ou responsáveis assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Análise estatística

O cálculo da amostra foi realizado através da fórmula para comparação de 2 médias, considerando significância de 5%, poder de 80% e desvio padrão de 4,265. Assim, foi estimado para cada braço 4 sujeitos, totalizando 8 sujeitos. Para esse protocolo, optou-se por uma amostra 20% maior, totalizando 10 sujeitos.

Os dados foram armazenados em banco de dados e analisados no software Stata e *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS), versão 22.0. Os escores da escala ABC, em uso de GRP e de placebo, foram comparadas através de análise de variância (ANOVA) com modelo ajustado para o delineamento *crossover* e o teste de McNemar para amostras pareadas. Para significância estatística, foi considerado um valor de p igual ou menor a 0,05.

Na análise descritiva, foram utilizadas média, desvio padrão, valor mínimo e valor máximo para as variáveis quantitativas e as frequências absolutas e relativas para as variáveis qualitativas.

Resultados

A amostra foi constituída de 10 crianças do sexo masculino. A idade variou de 4 a 9 anos, com média de 6,7 ($\pm 1,5$) anos. Quatro residiam em Porto Alegre (40%) e 6 na região metropolitana (60%). Sete pacientes faziam uso de medicações psicotrópicas (70%). Antipsicóticos (6/10) e anticonvulsivos (4/10) foram as mais frequentes. Em todos os pacientes as doses das medicações foram mantidas estáveis desde 4 semanas antes até a conclusão do estudo. Nove (90%) faziam pelo menos um tratamento não medicamentoso, entre eles psicologia, terapia ocupacional (TO), fonoaudiologia, hidroterapia ou equoterapia. As características da amostra estão resumidas na Tabela 1.

Houve uma redução nos escores da escala ABC e suas subescalas após o uso de GRP e placebo (Tabela 2). Apesar dessa redução ser mais proeminente após a infusão do GRP, principalmente nas subescalas Irritabilidade, Estereotipia e Hiperatividade, não houve diferença estatística desses resultados quando comparados ao placebo ($p 0,334$). Na segunda fase da pesquisa, em ambos os braços, os pacientes apresentaram escores basais menores que os da primeira fase, havendo nova redução desses escores após a segunda infusão, principalmente no grupo que recebeu GRP (Figura 2).

Após uma semana da infusão, 5 crianças apresentaram melhora dos sintomas com uso de GRP enquanto 2 melhoraram com uso de placebo, não existindo diferença estatística entre os grupos ($p 0,375$). Foi definida como melhora uma redução maior ou igual a 25% no escore total da escala ABC (Tabela 3).

Não houve efeitos adversos ou alterações dos sinais vitais associados ao uso de GRP em nenhum paciente. Os exames laboratoriais se mantiveram estáveis ou apresentaram pequenas variações sem significado clínico (Tabela 4). Todos os pacientes completaram o estudo.

Discussão

Até o momento nenhum tratamento disponível é capaz de reverter completamente os principais sintomas do TEA (BENVENUTO et al., 2013; ROSSIGNOL, 2009) e apenas dois medicamentos, risperidona e aripiprazol, são aprovados pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento de sintomas disruptivos nesses pacientes (KAPLAN; MCCRACKEN, 2012; MARCUS et al., 2009; OWEN et al., 2009; RESEARCH UNITS ON PEDIATRIC PSYCHOPHARMACOLOGY AUTISM NETWORK, 2005). O *Center for Disease Control and Prevention* (CDC) estimou em 2010 a prevalência do transtorno em 14,7 por 1000 crianças com idade de 8 anos, afetando 1 menino para cada 42 e uma menina para cada 189 (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2014), tornando o TEA um problema de saúde pública (BRENTANI et al., 2013) O efeito econômico direto e indireto substancial dos tratamentos para o TEA e o sofrimento familiar reforçam a necessidade de continuar a busca de intervenções efetivas para o transtorno (BUESCHER et al., 2014; KARST; VAN HECKE, 2012; SMITH; GREENBERG; MAILICK, 2014; WEISS et al., 2012).

Os neuropeptídeos desempenham um importante papel no funcionamento normal do SNC e são alvos terapêuticos promissores para o tratamento de vários distúrbios neurológicos (MCGONIGLE, 2012; ROESLER; SCHWARTSMANN, 2012). Os peptídeos possuem várias vantagens como moléculas terapêuticas. Em geral, possuem grande especificidade para seus receptores alvo, baixa reatividade cruzada e alta potência, requerendo doses mínimas. Ao contrário de muitas molécula terapêuticas, os peptídeos não se acumulam em tecidos e são eficientemente metabolizados por enzimas endógenas. Também possuem limitado potencial

para interação droga-droga e são tipicamente livres de complicações toxicológicas (MCGONIGLE, 2012).

O GRP tem sido implicado como possível causa do TEA após relato de uma paciente com exostose múltipla e autismo que apresentava translocação X:8 com interrupção no primeiro íntron do gene do GRPR (ISHIKAWA-BRUSH et al., 1997). Apesar de um estudo subsequente ao investigar dois locais polimórficos no segundo éxon do gene GRPR em pacientes com TEA não tenha encontrado suporte para o GRPR como um locus candidato para o autismo (MARUI et al., 2004), mais recentemente, outro estudo associou um papel potencial das mutações da cisteína na posição 6 e leucina na posição 181 na função do GRPR, e possivelmente na patogênese das perturbações autistas em dois pacientes (SEIDITA et al., 2008).

Em ensaios pré-clínicos, o bloqueio da ação dos GRPR no período neonatal em ratos levou a alterações comportamentais específicas do TEA, como déficit de interação social, padrões restritivos de comportamento, estereotípias motoras (MERALI et al., 2014; PRESTI-TORRES et al., 2007, 2012) e redução da preferência pelo odor materno, uma medida comportamental do apego (GARCIA et al., 2010). O bloqueio do GRPR durante o desenvolvimento do sistema nervoso central poderia levar a alterações comportamentais consistentes com TEA e apoiam a possibilidade de que a expressão ou função anormal do GRPR durante o desenvolvimento possa desempenhar um papel na patogênese da doença. (MERALI et al., 2014; PRESTI-TORRES et al., 2007, 2012; ROESLER; SCHWARTSMANN, 2012)

Nos estudos prévios com uso de GRP em 13 crianças autistas houve melhoras variáveis em sintomas do TEA como interação social, comportamentos repetitivos, irritabilidade, hiperatividade e comunicação (artigos em submissão). Além disso, o GRP mostrou-se seguro e bem tolerado, com efeitos adversos leves (diarreia, náuseas e *rash* cutâneo) em 3 crianças.

(artigo submetido). Porém não é possível aferir o tamanho do efeito placebo e o viés do observador nesses estudos, já que não foram controlados ou cegos.

O presente trabalho visa verificar se os achados anteriores se confirmam quando comparados ao placebo, com avaliadores e amostra cegos, além de certificar a tolerabilidade e segurança do GRP. Devido à grande variabilidade fenotípica e etiológica do TEA optou-se por um estudo *crossover* para homogeneização a amostra. Como o pico de melhora ocorreu na primeira semana após a infusão de GRP nos estudos anteriores os pesquisadores optaram por reavaliar os pacientes nesse período.

Houve redução dos escores da escala ABC após uso de GRP, principalmente das subescalas Hiperatividade, Irritabilidade e Comportamento estereotipado, semelhante aos resultados encontrados nos estudos prévios com GRP (artigos em submissão). As respostas foram variáveis em intensidade entre os indivíduos, e foi considerada como resposta positiva uma redução maior ou igual a 25% no escore da escala ABC basal, conforme literatura (GHANIZADEH; AYOOBZADEHSHIRAZI, 2015; MCCRACKEN et al., 2002; OWEN et al., 2009) (Tabela 3). Um número maior de crianças apresentou resposta positiva após uso de GRP (50%) em relação ao placebo (20%), porém não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p 0,375$). Nenhum paciente apresentou piora dos sintomas após a infusão de GRP. Nos indivíduos que responderam ao GRP, a melhora nos sintomas mostrou-se variável, o que poderia ser explicado pela heterogenicidade fenotípica e neurobiologia complexa do autismo.

As médias do escore total da escala ABC no grupo que recebeu a sequência GRP-Placebo apresentaram uma redução menos intensa na segunda fase (infusão de placebo), enquanto o grupo Placebo-GRP, apesar de ter apresentando melhora na primeira fase (infusão de placebo), apresentou nova queda acentuada dos escores na segunda fase (infusão de GRP) (Figura 2). Esse padrão de resposta sugere uma ação do GRP independente da sequência de

aplicação, enquanto o placebo obteve resultados mais proeminentes somente quando foi aplicado na primeira fase. Contudo, realizando-se a comparação dessas médias ajustados para o desenho *crossover* não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p = 0,334$).

É provável que o tamanho de efeito do GRP nos sintomas do TEA tenha sido superestimado nos trabalhos anteriores (artigos em submissão), e que apesar das médias da escala ABC terem maiores reduções após o uso do GRP em comparação ao placebo, o tamanho amostral reduzido e o delineamento *crossover* do estudo atual podem ter contribuído para que essa diferença não tenha sido estatisticamente significativa.

O uso de GRP foi seguro nos estudos prévios com humanos adultos (CLIVE; JODRELL; WEBB, 2001; GUTZWILLER et al., 1994) e com crianças autistas (observações não publicadas). No trabalho atual nenhum paciente apresentou efeitos adversos durante ou após a administração do GRP. Não houve alterações cardiovasculares nem ocorreram alterações laboratoriais com significado clínico. Esses dados sugerem que a administração de GRP a seres humanos a curto prazo é segura.

Conclusões

Os resultados deste estudo, apesar das limitações metodológicas e tamanho reduzido da amostra, reforçam os dados anteriores sobre a segurança do GRP utilizado a curto prazo. Apesar de ter ocorrido redução dos escores da escala ABC após uso de GRP, não houve diferença estatística em relação ao placebo. Devido à pequena amostra e desenho do estudo atual, não foi possível esclarecer a real eficácia do GRP na redução dos sintomas do TEA na infância. Existe a necessidade de novas pesquisas com outros delineamentos e tamanho

amostral maior, para confirmar a segurança e potencial terapêutico do GRP em crianças com autismo.

Agradecimentos

Ao Fundo de Investimento em Pesquisas e Eventos (FIPE-HCPA), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação *South American Office for Anticancer Drug Development* pelo suporte financeiro a este estudo.

Referências

AMAN, M. G. et al. The aberrant behavior checklist: a behavior rating scale for the assessment of treatment effects. **American Journal of Mental Deficiency**, v. 89, n. 5, p. 485-491, Mar. 1985.

ASSOCIATION, A. P. **Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders**, 5th ed., [s.l.]: American Psychiatric Publishing, 2013. DSM-5TM.

BENVENUTO, A. et al. Pharmacotherapy of autism spectrum disorders. **Brain & Development**, v. 35, n. 2, p. 119-127, Feb. 2013.

BRENTANI, H. et al. Autism spectrum disorders: an overview on diagnosis and treatment. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 35 Supl. 1, p. S62-72, 2013. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1516-44462013000500008&script=sci_arttext>. Acesso em: 19 set. 2015.

BUESCHER, A. V. S. et al. Costs of autism spectrum disorders in the United Kingdom and the United States. **JAMA Pediatrics**, v. 168, n. 8, p. 721-728, Aug. 2014.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Prevalence of autism spectrum disorder among children aged 8 years - autism and developmental disabilities monitoring network, 11 sites, United States, 2010. **Morbidity and Mortality Weekly Report: Surveillance Summaries**, v. 63, n. 2, p. 1-21, 28 mar. 2014. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/ss6302a1.htm>>. Acesso em: 19 Sept. 2015.

CLIVE, S.; JODRELL, D.; WEBB, D. Gastrin-releasing peptide is a potent vasodilator in humans. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 69, n. 4, p. 252-259, Apr. 2001.

GARCIA, V. A. et al. Neonatal gastrin-releasing peptide receptor blockade reduces maternal odor preference in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 214, n. 2, p. 456-459, 25 Dec. 2010.

GHANIZADEH, A.; AYOOBZADEHSHIRAZI, A. A randomized double-blind placebo-controlled clinical trial of adjuvant buspirone for irritability in autism. **Pediatric Neurology**, v. 52, n. 1, p. 77-81, Jan. 2015.

GONZALEZ, N. et al. Bombesin-related peptides and their receptors: recent advances in their role in physiology and disease states. **Current Opinion in Endocrinology, Diabetes, and Obesity**, v. 15, n. 1, p. 58-64, Feb. 2008.

GUO, M.; QU, X.; QIN, X.-Q. Bombesin-like peptides and their receptors: recent findings in pharmacology and physiology. **Current Opinion in Endocrinology, Diabetes, and Obesity**, v. 22, n. 1, p. 3-8, Feb. 2015.

GUTZWILLER, J. P. et al. Effect of intravenous human gastrin-releasing peptide on food intake in humans. **Gastroenterology**, v. 106, n. 5, p. 1168-1173, May 1994.

ISHIKAWA-BRUSH, Y. et al. Autism and multiple exostoses associated with an X:8 translocation occurring within the GRPR gene and 3' to the SDC2 gene. **Human Molecular Genetics**, v. 6, n. 8, p. 1241-1250, Aug. 1997.

KAAT, A. J.; LECAVALIER, L.; AMAN, M. G. Validity of the aberrant behavior checklist in children with autism spectrum disorder. **Journal of Autism and Developmental Disorders**, v. 44, n. 5, p. 1103-1116, maio 2014.

KAPLAN, G.; MCCRACKEN, J. T. Psychopharmacology of autism spectrum disorders. **Pediatric Clinics of North America**, v. 59, n. 1, p. 175-187, xii, fev. 2012.

KARST, J. S.; VAN HECKE, A. V. Parent and family impact of autism spectrum disorders: a review and proposed model for intervention evaluation. **Clinical Child and Family Psychology Review**, v. 15, n. 3, p. 247-277, Sept. 2012.

LIU, Q.-Q. et al. [Spinal gastrin-releasing peptide system mediates sexual function of males: advances in studies]. **Zhonghua Nan Ke Xue = National Journal of Andrology**, v. 20, n. 6, p. 554-557, June 2014.

LOSAPIO, M. F. et al. Adaptação transcultural parcial da escala Aberrant Behavior Checklist (ABC), para avaliar eficácia de tratamento em pacientes com retardo mental. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 27, n. 5, p. 909-923, maio 2011. Disponível em:

<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-311X2011000500009>.
Acesso em: 19 set 2015.

MARCUS, R. N. et al. A placebo-controlled, fixed-dose study of aripiprazole in children and adolescents with irritability associated with autistic disorder. **Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry**, v. 48, n. 11, p. 1110-1119, Nov. 2009.

MCCRACKEN, J. T. et al. Risperidone in children with autism and serious behavioral problems. **The New England Journal of Medicine**, v. 347, n. 5, p. 314-321, 1 Aug. 2002. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa013171>>. Acesso em: 19 set. 2015.

MCGONIGLE, P. Peptide therapeutics for CNS indications. **Biochemical Pharmacology**, v. 83, n. 5, p. 559-566, 1 mar. 2012.

MERALI, Z. et al. Long-term behavioral effects of neonatal blockade of gastrin-releasing peptide receptors in rats: similarities to autism spectrum disorders. **Behavioural Brain Research**, v. 263, p. 60-69, 15 Apr. 2014.

MOODY, T. W.; MERALI, Z. Bombesin-like peptides and associated receptors within the brain: distribution and behavioral implications. **Peptides**, v. 25, n. 3, p. 511-520, Mar. 2004.

OWEN, R. et al. Aripiprazole in the treatment of irritability in children and adolescents with autistic disorder. **Pediatrics**, v. 124, n. 6, p. 1533-1540, Dec. 2009. Disponível em: <<http://pediatrics.aappublications.org/content/124/6/1533.long>>. Acesso em: 19 set. 2015.

PRESTI-TORRES, J. et al. Impairments of social behavior and memory after neonatal gastrin-releasing peptide receptor blockade in rats: Implications for an animal model of neurodevelopmental disorders. **Neuropharmacology**, v. 52, n. 3, p. 724-732, Mar. 2007.

PRESTI-TORRES, J. et al. Rescue of social behavior impairment by clozapine and alterations in the expression of neuronal receptors in a rat model of neurodevelopmental impairment induced by GRPR blockade. **Journal of Neural Transmission**, v. 119, n. 3, p. 319-327, Mar. 2012.

RESEARCH UNITS ON PEDIATRIC PSYCHOPHARMACOLOGY AUTISM NETWORK. Randomized, controlled, crossover trial of methylphenidate in pervasive developmental disorders with hyperactivity. **Archives of General Psychiatry**, v. 62, n. 11, p. 1266-1274, nov. 2005.

ROESLER, R. et al. Gastrin-releasing peptide receptor signaling in the integration of stress and memory. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 112, p. 44-52, July. 2014.

ROESLER, R.; HENRIQUES, J. A. P.; SCHWARTSMANN, G. Gastrin-releasing peptide receptor as a molecular target for psychiatric and neurological disorders. **CNS & Neurological Disorders Drug Targets**, v. 5, n. 2, p. 197-204, Apr. 2006.

ROESLER, R.; SCHWARTSMANN, G. Gastrin-releasing peptide receptors in the central nervous system: role in brain function and as a drug target. **Frontiers in Endocrinology**, v. 3, p. 159, 2012.

ROSSIGNOL, D. A. Novel and emerging treatments for autism spectrum disorders: a systematic review. **Annals of Clinical Psychiatry: Official Journal of the American Academy of Clinical Psychiatrists**, v. 21, n. 4, p. 213-236, Dec. 2009.

SAKAMOTO, H. et al. Sexually dimorphic gastrin releasing peptide system in the spinal cord controls male reproductive functions. **Nature Neuroscience**, v. 11, n. 6, p. 634-636, jun. 2008.

SEIDITA, G. et al. Analysis of the gastrin-releasing peptide receptor gene in Italian patients with autism spectrum disorders. **American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics: the Official Publication of the International Society of Psychiatric Genetics**, v. 147B, n. 6, p. 807-813, 5 Sept. 2008.

SMITH, L. E.; GREENBERG, J. S.; MAILICK, M. R. The family context of autism spectrum disorders: influence on the behavioral phenotype and quality of life. **Child and Adolescent Psychiatric Clinics of North America**, v. 23, n. 1, p. 143-155, Jan. 2014.

SUN, Y.-G.; CHEN, Z.-F. A gastrin-releasing peptide receptor mediates the itch sensation in the spinal cord. **Nature**, v. 448, n. 7154, p. 700-703, 9 Aug. 2007.

WEBER, H. C. Regulation and signaling of human bombesin receptors and their biological effects. **Current Opinion in Endocrinology, Diabetes, and Obesity**, v. 16, n. 1, p. 66-71, Feb. 2009.

WEBER, H. C. Gastrointestinal peptides and itch sensation. **Current Opinion in Endocrinology, Diabetes, and Obesity**, v. 22, n. 1, p. 29-33, Feb. 2015.

WEISS, J. A. et al. The impact of child problem behaviors of children with ASD on parent mental health: the mediating role of acceptance and empowerment. **Autism: The International Journal of Research and Practice**, v. 16, n. 3, p. 261-274, May 2012.

Tabela 1 - Características da amostra

Sujeito	Idade	Terapias não farmacológicas	Medicamentos
1	6 anos	Escola, Fonoaudiologia, Psicopedagogia	sem medicamentos
2	6 anos	Escola, TO, Fonoaudiologia, Psicopedagogia, Psicologia	Risperidona, Ácido Valpróico
3	5 anos	sem terapias	sem medicamentos
4	4 anos	Escola, TO, psicologia	sem medicamentos
5	6 anos	Fonoaudiologia, Psicologia	Risperidona
6	8 anos	Psicopedagogia, Psicologia	Melatonina
7	8 anos	Escola, TO, Psicologia, Psicopedagoga	Clorpromazina, Quetiapina, Buspirona
8	8 anos	Escola, Hidroterapia	Risperidona, Ácido Valpróico, Clonidina, Escitalopram
9	7 anos	Escola, Fonoaudiologia, Psicopedagogia, Psicologia	Risperidona, Carbamazepina
10	9 anos	Escola, TO, Fonoaudiologia	Ácido Valpróico, Aripiprazole

Tabela 2 – Médias dos escores da escala ABC e suas subescalas dos 10 pacientes

	Grupo A				Grupo B				Valor p
	Fase 1		Fase 2		Fase 1		Fase 2		
	GRP	Pós Infusão	Placebo	Pós Infusão	Placebo	Pós Infusão	GRP	Pós Infusão	
ABC Total	82,60	65,00	58,80	57,40	77,20	68,20	64,80	46,40	0.3343
ABC Irritabilidade	23,40	21,20	18,60	20,40	18,40	12,40	13,20	9,60	0.6173
ABC Letargia	16,60	11,80	11,00	7,80	14,00	13,20	11,60	8,80	0.9112
ABC C. estereotipado	9,00	6,40	5,60	4,40	11,80	10,00	10,80	7,60	0.8504
ABC Hiperatividade	31,20	24,00	22,80	23,20	28,80	28,00	24,20	16,00	0.1718
ABC Fala inapropriada	2,40	1,60	0,80	1,60	4,20	4,60	5,00	4,40	0.8473

Tabela 3 – Variação em porcentagem do escore total da escala ABC após GRP e placebo em cada sujeito

	Placebo			GRP		
	Basal	Pós Infusão	Variação %	Basal	Pós Infusão	Variação %
Paciente 1	82	81	-1,2	85	34	-60,0
Paciente 2	75	76	+1,3	71	70	-1,4
Paciente 3	65	75	+15,4	122	68	-44,3
Paciente 4	35	30	-14,3	52	36	-30,8
Paciente 5	80	55	-31,3	92	86	-6,5
Paciente 6	66	58	-12,1	59	43	-27,1
Paciente 7	73	52	-28,8	44	28	-36,4
Paciente 8	90	74	-17,8	65	57	-12,3
Paciente 9	48	61	+27,1	62	50	-19,4
Paciente 10	66	66	0,0	85	85	0,0

Tabela 4 – Exames laboratoriais pré e após infusão do GRP

	Paciente 1		Paciente 2		Paciente 3		Paciente 4		Paciente 5		Paciente 6		Paciente 7		Paciente 8		Paciente 9		Paciente 10	
	pré	pós	pré	pós	pré	pós	pré	pós	pré	pós	pré	pós	pré	pós	pré	pós	pré	pós	pré	pós
TGO	33	31	24	27	40	44	21	b	30	20	31	32	23	23	24	27	20	21	27	30
Amilase	41	37	97	89	a	46	51	b	85	66	77	69	96	97	37	37	61	57	67	70
TGP	17	15	12	14	24	26	11	b	15	9	13	19	17	16	13	15	14	21	14	16
B. Dir	0,2	0,2	0,2	0,3	0,2	0,2	0,2	b	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
B. Ind	0,2	0,2	0,1	0,6	0,1	0,1	0,1	b	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
B. Total	0,4	0,4	0,3	0,9	0,3	0,3	0,3	b	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Creat	0,56	0,5	0,3	0,9	0,4	0,3	0,31	b	0,3	0,3	0,36	0,35	0,86	0,64	0,4	0,41	0,48	0,43	0,3	0,3
GGT	11	10	9	9	16	13	18	b	17	29	21	24	12	13	18	15	23	23	16	17
Glicose	66	84	89	77	104	92	75	b	101	77	92	82	61	75	103	97	66	89	109	108
Hb	13,7	13,6	12,2	12,3	12,2	10,6	11,5	11,5	10,9	10,8	13,6	13,4	13,2	12	10,8	10,7	11,8	11,5	11	11,7
Ht	39,7	38,5	36,3	36,6	36,6	31,5	33,7	33,6	34,2	33,5	39,8	39,5	36,1	36	31,4	32	35,4	33,8	33,1	35,3
Leuco	7900	6180	10280	9720	14230	7070	10720	11730	6600	4490	7860	5070	8640	7400	6820	5980	8260	8640	6710	6990
Seg	3400	2660	5500	5070	5830	2640	5820	6850	2970	2180	5540	3070	3290	2760	2350	2470	4470	5070	2860	3060
Eos	280	260	1170	930	280	440	380	550	160	80	400	500	820	550	580	600	550	620	100	150
Mono	570	540	1080	970	1150	460	950	1040	940	540	520	480	760	640	820	620	590	650	580	660
Linf	3620	2690	2490	2710	6830	3510	3480	3240	2500	1670	1740	1450	3750	3430	3040	2260	2620	2280	3150	3100
Plaq	485.	437.	279.	263.	530.	332.	324.	324.	266.	275.	351.	359.	302.	287.	322.	c	331.	312.	253.	306.
Uréia	30	25	28	27	50	44	25	b	29	29	32	29	23	19	22	30	34	26	17	15

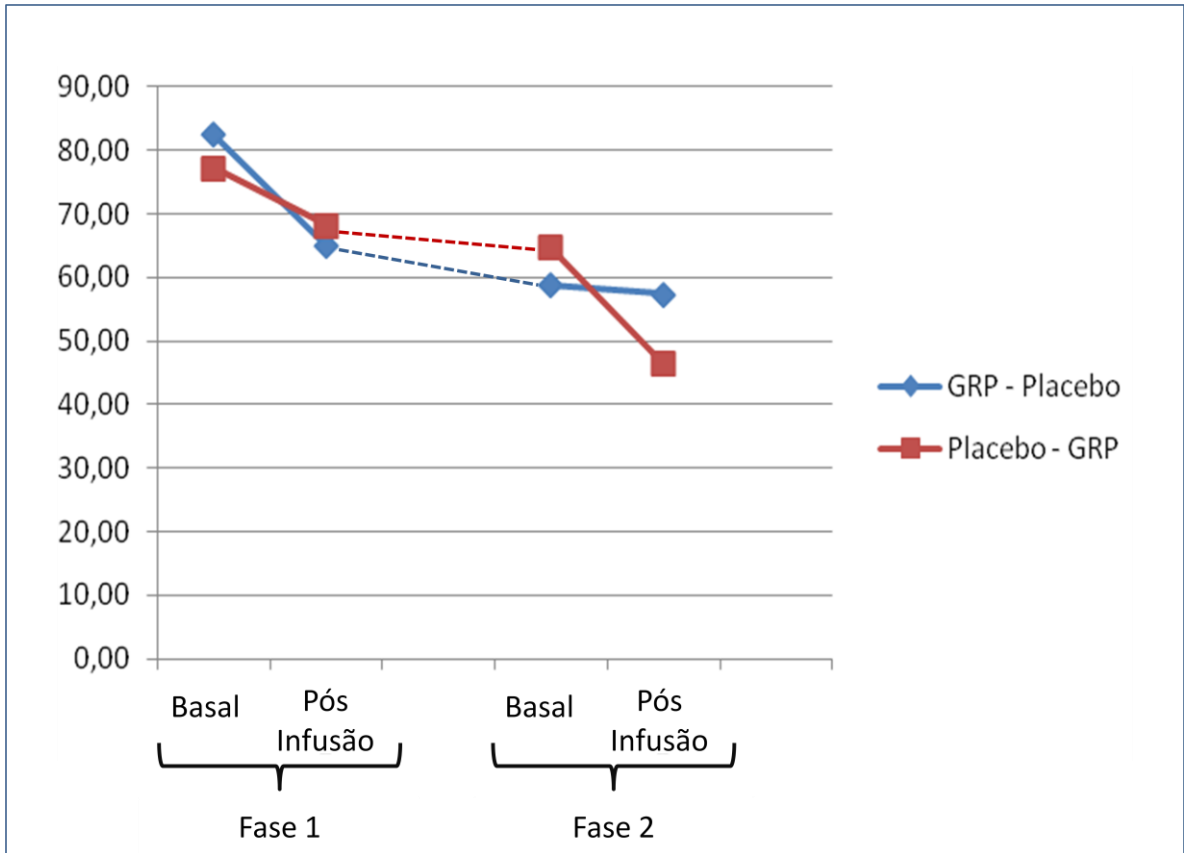
B. Dir – bilirrubina direta, B. Ind – bilirrubina indireta, B. Total – bilirrubina total, Creat. – creatinina, GGT – gama-GT, Hb – hemoglobina, Ht – hematócrito, Leuco – leucócitos, Seg – segmentados, Eos – eosinófilos, Mono – monócitos, Linf – linfócitos, Plaq – plaquetas, a- amostra insuficiente, b- hemólise, c- plaquetas agregadas, avaliação de lâmina normal.

Figura 1 – Logística do estudo

	Tratamento					Wash out			Crossover					
	V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7	V8	V9	V10	V11	V12	V13	V 14
	2ª feira	3ª feira	4ª feira	5ª feira	6ª feira	6ª feira	6ª feira	6ª feira	2ª feira	3ª feira	4ª feira	5ª feira	6ª feira	6ª feira
Infusão		X	X	X	X					X	X	X	X	
Escalas	X					X			X					x
Coleta de sangue		X			X					X			X	
		W1				W2	W3	W4		W5				W6

W= Semana, V=Visita

Figura 2 – Escores médios da Escala ABC



9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Desde sua descrição inicial por Kanner, o TEA tem apresentado um aumento progressivo de prevalência, com grande impacto na qualidade de vida dos indivíduos afetados e de sua família e gerando grandes custos sociais e econômicos. Apesar dos avanços das pesquisas, a neurobiologia do transtorno ainda não está completamente esclarecida, e seu diagnóstico permanece clínico, sem um marcador biológico específico.

Os avanços no tratamento medicamentoso e não farmacológico tem melhorado a qualidade de vida dos pacientes com TEA, contudo, nenhuma intervenção até o momento conseguiu agir de forma eficaz nos sintomas nucleares da patologia a ponto de modificar sua história natural. A investigação de novos tratamentos para o TEA são muito importantes, e diversas linhas de pesquisa estão em avanço.

Estudos anteriores com administração de GRP em crianças autistas sugerem que o peptídeo possa ser efetivo em melhorar alguns dos sintomas específicos do espectro autista, principalmente compulsões e déficits na interação social, além dos sintomas de baixa tolerância à frustração, auto e heteroagressividade e crises de birra. Mostrando-se seguro e com boa tolerabilidade.

Os resultados deste estudo, apesar das limitações metodológicas e tamanho reduzido da amostra, reforçam os dados anteriores sobre a segurança do GRP utilizado a curto prazo. Apesar de ter ocorrido redução dos escores da escala ABC após uso de GRP, não houve diferença estatística em relação ao placebo. Devido à pequena amostra e desenho do estudo atual, não foi possível esclarecer a real eficácia do GRP na redução dos sintomas do TEA na infância. É provável que o tamanho do efeito terapêutico do GRP seja menor que o sugerido pelos estudos anteriores, existindo a necessidade de novas pesquisas com outros delineamentos e tamanho amostral maior, para confirmar a eficácia e segurança do GRP em crianças com autismo.

APÊNDICE A – FICHA DE IDENTIFICAÇÃO DE VOLUNTÁRIOS

Nome do paciente: _____

Nome completo dos pais: _____

Telefone para contato com os pais: _____

Data de nascimento: _____

Tem diagnóstico de autismo? () Sim; () Não;

Exames prévios (descrever os que tiver):

-eletroencefalograma: _____

-tomografia computadorizada ou ressonância magnética de crânio: _____

-exames genéticos: _____

Tratamento medicamentoso atual (nome do medicamento e dose): _____

Tratamentos medicamentosos prévios (nome dos medicamentos): _____

Tratamentos não farmacológicos:

() fonoaudiologia () psicologia

() terapia ocupacional () psicomotricista () ambientoterapia

() ecoterapia () hidroterapia

Local em que realiza os tratamentos: _____

Nome do médico neurologista assistente: _____

Telefone para contato com o médico assistente: _____

Carimbo e assinatura do médico (a) _____

APÊNDICE B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Seu (sua) filho(a) está sendo convidado(a) a participar de uma pesquisa para crianças que têm diagnóstico de autismo. Antes de decidir, é importante que você compreenda o motivo da realização desta pesquisa e tudo o que ela envolve. Leia esse termo de consentimento livre e esclarecido com calma e esclareça todas as suas dúvidas. Obrigado.

Até hoje, não existe ainda nenhum tratamento específico que cure o autismo. Os tratamentos disponíveis melhoram apenas alguns dos sintomas, como a agitação e a agressividade. Nos últimos anos, tem sido estudada uma substância chamada “peptídeo liberador de gastrina (GRP)”. Pesquisas em animais mostram que a falta de GRP pode dar sintomas autistas, como falta de apego e diminuição da interação social. Já existem pesquisas em pessoas usando o GRP, principalmente para alterações alimentares e de apetite, mas ainda são poucas.

O uso desta substância, GRP, em pessoas foi seguro, com poucos efeitos colaterais, como diminuição da pressão arterial do sangue que foi rapidamente resolvida após parar o tratamento com GRP. Outro efeito colateral possível de aparecer é o aumento da secreção de ácidos no estômago, podendo dar úlceras, o que é raro se o paciente receber um tratamento adequado para prevenir.

O objetivo desta pesquisa é para ver se há melhora nos sintomas do autismo. A avaliação dos sintomas será feita através de entrevistas com a família, com perguntas sobre o comportamento do seu filho(a), sua capacidade de interagir e de se comunicar com outras pessoas, além da observação da família em relação ao seu filho(a).

Além da medicação que seu (sua) filho(a) usa para o autismo, seu (sua) filho(a) receberá o tratamento em estudo, GRP e um placebo. O placebo é uma medicação sem ação, parecida com o GRP. O tratamento da pesquisa será feito em dois ciclos (fases) e será escolhido por sorteio. Nenhum paciente da pesquisa ficará sem receber o tratamento em estudo, GRP. É importante que você entenda que em nenhum momento da pesquisa, seu filho(a) ficará sem tratamento, já que o tratamento que seu filho(a) já usa não será suspenso. Nem você, nem seu filho (a) e nem o (a) médico(a) responsável pela pesquisa vão saber qual tratamento seu (sua) filho(a) está recebendo, embora o (a) médico(a) responsável tenha meios para rapidamente descobrir, caso necessário. O tratamento é feito por via venosa (injeção na veia). Caso aceite que seu filho(a) participe, você e seu filho(a) precisarão vir a este hospital para as consultas com o médico da pesquisa. Ao todo serão 5 semanas de tratamento para que

os médicos da pesquisa possam avaliar o tratamento em estudo, GRP. Não vai ser preciso de internação hospitalar.

Na visita de seleção/inclusão, o (a) médico(a) da pesquisa avaliará se seu (sua) filho(a) poderá participar do estudo e explicará a você(s) e a seu filho(a) todas as etapas, riscos e benefícios da pesquisa. Caso concorde em permitir que seu filho(a) participe da pesquisa, você deverá assinar duas vias do termo de consentimento livre e esclarecido (este documento que está lendo), que é o documento onde o (a) médico(a) da pesquisa garante ao participante todos os seus direitos. Uma destas vias será entregue para você imediatamente para sua informação. Ao final desta visita de inclusão, caso seu filho(a) atenda a todos os critérios de inclusão, a medicação em estudo (GRP ou placebo) será prescrita a ele(a).

O tratamento em estudo será feito na veia sob acompanhamento de um dos médicos da pesquisa para o caso de surgir algum efeito colateral. Caso isso aconteça, nos comprometemos em parar imediatamente o tratamento. Será feita também uma medicação que evita o aumento de secreção ácida do estômago e diminui o risco de úlcera. Pelo que sabemos até o momento, a administração da medicação da pesquisa a seres humanos, por um período curto de tempo, é segura e não traz risco de vida.

Serão coletadas 4 amostras de sangue (cerca de 5 ml de sangue por amostra, que equivale a uma colher de chá) para análise dos componentes padrões do sangue. Estas amostras serão realizadas retirando de um pouquinho de sangue da veia do seu filho(a) na visita de seleção, nas visitas V5, V9 e V13. Na pesquisa, um total de cerca de 20ml será coletado, o que equivale a 4 colheres de chá. Essa quantidade não prejudica ou traz risco ao seu filho(a). As coletas de sangue serão feitas sempre antes da infusão da medicação da pesquisa para evitar punções venosas (pegar a veia) desnecessárias.

Podem existir algumas complicações leves devido à coleta, como desconforto temporário, dor ou sangramento, inchaço ou um machucado no local onde entra a agulha durante a coleta de sangue. Muito raramente, pode ocorrer um entupimento da veia por um pouco de sangue que engrossou (coágulo) ou infecção que necessita de tratamento. Para limitar ao máximo possível estes riscos, seu filho(a) estará sob supervisão médica rigorosa no momento destas coletas.

É importante que entenda que não existe garantia de que este tratamento funcionará para melhorar os sintomas do seu filho(a), esta é uma pesquisa e foi feita em poucos pacientes autistas até hoje. Nesses pacientes a administração da substância não teve nenhum efeito indesejável, mostrou-se segura e teve alguns resultados positivos, de melhora dos sintomas.

O tratamento da pesquisa não existe para vender nem no nosso país e nem em nenhum outro país atualmente. A pesquisa quer avaliar efeitos a curto prazo. Não se conhecem efeitos com o uso prolongado desta substância. Mesmo que haja benefícios no(a) seu (sua) filho(a) com o uso da substância, no momento essa não será fornecida para utilização após o término da pesquisa, pois novas pesquisas serão necessárias para avaliar sua segurança em utilização a longo prazo. Se houver claro benefício nos sintomas do(a) seu (sua) filho(a) e se outras pesquisas que serão feitas no futuro mostrarem que o seu uso a longo prazo é seguro, nos responsabilizaremos em fornecer o GRP para o tratamento do(a) seu filho(a) sem custo algum e sem nenhuma restrição. Toda e qualquer despesa associada especificamente a essa pesquisa (consultas, transporte de ida e volta do centro para você e seu (sua) filho(a) serão pagos ou reembolsados pelo médico da pesquisa).

É importante que você informe ao médico da pesquisa sobre qualquer medicação que seu (sua) filho(a) esteja tomando antes do estudo, uma vez que algumas destas poderão não ser permitidas durante o estudo.

Sua decisão de concordar e permitir que seu (sua) filho(a) participe deste estudo é totalmente voluntária. Caso escolha não permitir que seu (sua) filho(a) participe, isto não afetará o padrão de tratamento que ele(a) recebe. A não participação nesta pesquisa não causará qualquer mudança no atendimento do seu filho caso ele seja paciente do ambulatório de neurologia infantil e também não implicará em nenhum custo para você, seu filho(a) ou para a sua família. A participação nesta pesquisa em pacientes que não acompanham no HCPA não garante seguimento neste hospital após o término da pesquisa. Nesses casos, orientaremos qual a melhor conduta a ser seguida e qual serviço a ser procurado.

Caso decida permitir que seu (sua) filho(a) participe, você ainda é livre para solicitar a retirada de seu (sua) filho(a) a qualquer momento. Neste caso, o (a) médico(a) responsável pela pesquisa poderá perguntar a você o motivo para esta retirada. Esta decisão não afetará o padrão de tratamento recebido por seu (sua) filho(a), mas é de extrema importância para o médico.

A identidade do seu filho(a) será mantida em sigilo durante toda a pesquisa e a divulgação dos resultados. Se você decidir retirar seu (sua) filho(a) da pesquisa, qualquer evento adverso não resolvido neste momento será acompanhado pelo médico da pesquisa até sua resolução, garantindo seu acompanhamento clínico. Se seu filho(a) apresentar um novo evento adverso, você responsável por ele(a) deverá entrar em contato com o médico da pesquisa. Se seu (sua) filho(a) for retirado da pesquisa por motivo que não sua própria

decisão, o médico da pesquisa poderá contatá-lo para solicitar quaisquer informações relevantes e/ou documentação sobre o tratamento médico de seu (sua) filho(a).

Os dados e os resultados desta pesquisa poderão ser publicados em periódicos médicos ou utilizados em relatórios científicos, porém os dados que possam identificar seu (sua) filho(a) nunca aparecerão. Todos os dados médicos de seu (sua) filho(a) serão tratados com rigorosa confidencialidade respeitando a legislação brasileira. Caso deseje, ao final da pesquisa, você poderá ser informado pelo médico da pesquisa sobre os resultados gerais da pesquisa, quando forem disponibilizados.

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisas em Seres Humanos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

O sujeito de pesquisa e seus responsáveis legais receberam uma via original deste termo de consentimento livre e esclarecido. Em caso de qualquer dúvida ou qualquer problema que venha a ocorrer, os pesquisadores podem ser encontrados nos telefones abaixo:

Contatos:

Pesquisador responsável - Dr. Gilberto Schwartzmann (telefone 33598012); endereço no Hospital de Clínicas de Porto Alegre: 3º andar leste, sala 399.

Pesquisador responsável - Dr. Rudimar dos Santos Riesgo (telefone 33598486); endereço no Hospital de Clínicas de Porto Alegre: 11º andar, sala 1145.

Pesquisadora - Dra. Michele Becker (telefone 33598486 / 91167350); endereço no Hospital de Clínicas de Porto Alegre: 11º andar, sala 1145.

Pesquisador - Dr. Josemar Marchezan (telefone 33598486 / 99073034); endereço no Hospital de Clínicas de Porto Alegre: 11º andar, sala 1145.

Comitê de Ética em Pesquisa - telefone 33597640

“Nós, _____ (nome do pai) e _____ (nome da mãe), pais e/ou representantes legais do (a) paciente _____ após recebermos todas as informações necessárias e esclarecer todas as nossas dúvidas, autorizamos nosso (a) filho (a) a participar desta pesquisa. Nós entendemos também que, se for da nossa vontade, a qualquer momento, tem a liberdade de retirar a participação de nosso (a) filho (a) sem que essa decisão afete, de forma nenhuma, o padrão de tratamento que nosso (a) filho (a) recebe do seu médico.

(Assinatura do pai)

(Assinatura da mãe)

Nome do pesquisador que aplicou o TCLE

Assinatura do pesquisador que aplicou o TCLE

Porto Alegre, ____ de _____ de 201__.

APÊNDICE C – EXAMES LABORATORIAIS PRÉ E PÓS GRP

	Paciente 1		Paciente 2		Paciente 3		Paciente 4		Paciente 5		Paciente 6		Paciente 7		Paciente 8		Paciente 9		Paciente 10	
	pré	pós	pré	pós	pré	pós	pré	pós	pré	pós	pré	pós	pré	pós	pré	pós	pré	pós	pré	pós
TGO	33	31	24	27	40	44	21	b	30	20	31	32	23	23	24	27	20	21	27	30
Amilase	41	37	97	89	a	46	51	b	85	66	77	69	96	97	37	37	61	57	67	70
TGP	17	15	12	14	24	26	11	b	15	9	13	19	17	16	13	15	14	21	14	16
B. Dir	0,2	0,2	0,2	0,3	0,2	0,2	0,2	b	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
B. Ind	0,2	0,2	0,1	0,6	0,1	0,1	0,1	b	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
B. Total	0,4	0,4	0,3	0,9	0,3	0,3	0,3	b	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Creat	0,56	0,5	0,3	0,9	0,4	0,3	0,31	b	0,3	0,3	0,36	0,35	0,86	0,64	0,4	0,41	0,48	0,43	0,3	0,3
GGT	11	10	9	9	16	13	18	b	17	29	21	24	12	13	18	15	23	23	16	17
Glicose	66	84	89	77	104	92	75	b	101	77	92	82	61	75	103	97	66	89	109	108
Hb	13,7	13,6	12,2	12,3	12,2	10,6	11,5	11,5	10,9	10,8	13,6	13,4	13,2	12	10,8	10,7	11,8	11,5	11	11,7
Ht	39,7	38,5	36,3	36,6	36,6	31,5	33,7	33,6	34,2	33,5	39,8	39,5	36,1	36	31,4	32	35,4	33,8	33,1	35,3
Leuco	7900	6180	10280	9720	14230	7070	10720	11730	6600	4490	7860	5070	8640	7400	6820	5980	8260	8640	6710	6990
Seg	3400	2660	5500	5070	5830	2640	5820	6850	2970	2180	5540	3070	3290	2760	2350	2470	4470	5070	2860	3060
Eos	280	260	1170	930	280	440	380	550	160	80	400	500	820	550	580	600	550	620	100	150
Mono	570	540	1080	970	1150	460	950	1040	940	540	520	480	760	640	820	620	590	650	580	660
Linf	3620	2690	2490	2710	6830	3510	3480	3240	2500	1670	1740	1450	3750	3430	3040	2260	2620	2280	3150	3100
Plaq	485.	437.	279.	263.	530.	332.	324.	324.	266.	275.	351.	359.	302.	287.	322.	c	331.	312.	253.	306.
Uréia	30	25	28	27	50	44	25	b	29	29	32	29	23	19	22	30	34	26	17	15

B. Dir – bilirrubina direta, B. Ind – bilirrubina indireta, B. Total – bilirrubina total, Creat. – creatinina, GGT – gama-GT, Hb – hemoglobina, Ht – hematócrito, Leuco – leucócitos, Seg – segmentados, Eos – eosinófilos, Mono – monócitos, Linf – linfócitos, Plaq – plaquetas, a- amostra insuficiente, b- hemólise, c- plaquetas agregadas, avaliação de lâmina normal.

APÊNDICE D – EXAMES LABORATORIAIS PRÉ E PÓS-PLACEBO

	Paciente 1		Paciente 2		Paciente 3		Paciente 4		Paciente 5		Paciente 6		Paciente 7		Paciente 8		Paciente 9		Paciente 10	
	pré	Pós	pré	pós	pré	pós	pré	pós	pré	pós	pré	pós	pré	pós	pré	pós	pré	pós	pré	pós
TGO	33	34	25	23	36	50	10	21	23	20	36	ab	22	21	23	23	20	16	50	45
Amilase	43	41	98	83	43	42	62	53	a	59	88	ab	93	113	33	37	51	59	58	61
TGP	17	18	10	12	22	21	20	9	14	9	12	ab	15	15	15	16	10	10	28	24
B. Dir	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	ab	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
B. Ind	0,1	0,2	0,5	0,4	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	ab	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1
B. Total	0,3	0,4	0,7	0,6	0,3	0,4	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	ab	0,3	0,3	0,3	0,3	0,4	0,3	0,4	0,3
Creat	0,41	0,5	0,31	0,3	0,37	0,4	0,35	0,32	0,3	0,3	0,33	ab	0,62	0,56	0,35	0,71	a	0,44	0,37	0,34
GGT	11	10	11	7	17	11	13	11	16	15	16	ab	12	14	17	18	23	24	20	16
Glicose	62	95	81	81	81	89	75	79	99	89	82	ab	80	52	93	75	99	94	146	119
Hb	13,4	13,2	12,6	12,1	11,9	11,6	11,8	11,6	11,4	11	13,5	ab	12,1	13,1	11,1	11,2	12,2	11,1	11,4	11,4
Ht	37,9	37,1	36,8	36	34,6	33,8	35,8	34,6	34,7	33,9	38,8	ab	36,5	39,4	31,2	32,7	35,6	32,9	35,1	34
Leuco	6750	8030	12380	13390	7250	7160	8310	8160	4620	5140	6390	ab	8980	8300	7130	8430	8140	7360	5690	4770
Seg	2820	3680	7980	8210	2900	2740	3560	3420	2320	2820	3790	ab	3710	3110	2400	4070	4760	4400	3220	1510
Eos	440	590	810	440	270	640	380	390	100	130	110	ab	780	750	950	660	420	340	150	900
Mono	610	600	1320	1720	490	670	650	660	690	550	530	ab	780	720	590	820	530	390	730	540
Linfo	2840	3140	2240	2990	3570	3090	3690	3650	1500	1620	1950	ab	3680	3690	3150	2860	2410	2210	1580	2620
Plaq	450.	445.	302.	285.	288.	278.	278.	284.	252.	254.	309.	ab	323.	325.	258.	310.	301.	310.	223.	249.
Uréia	31	39	27	22	44	28	27	26	32	33	27	ab	25	28	22	32	22	33	37	19

B. Dir – bilirrubina direta, B. Ind – bilirrubina indireta, B. Total – bilirrubina total, Creat. – creatinina, GGT – gama-GT, Hb – hemoglobina, Ht – hematócrito, Leuco – leucócitos, Seg – segmentados, Eos – eosinófilos, Mono – monócitos, Linf – linfócitos, Plaq – plaquetas, a- amostra insuficiente, b- hemólise.