

UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

JAIME LIN

**O TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA COMO UM
SINTOMA E NÃO UM DIAGNÓSTICO: CONSIDERAÇÕES
CLÍNICAS E PRÉ-CLÍNICAS EM BUSCA DA COMPREENSÃO DO
AUTISMO**

CRICIÚMA

2022

JAIME LIN

**O TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA COMO UM
SINTOMA E NÃO UM DIAGNÓSTICO: CONSIDERAÇÕES
CLÍNICAS E PRÉ-CLÍNICAS EM BUSCA DA COMPREENSÃO DO
AUTISMO**

Tese de Doutorado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde para obtenção do título de Doutora em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Cinara Ludvig
Gonçalves

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Jade de Oliveira

CRICIÚMA

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

L735t Lin, Jaime.

O transtorno do espectro autista como um sintoma e não um diagnóstico : considerações clínicas e pré-clínicas em busca da compreensão do autismo / Jaime Lin. - 2022.

149 p. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2022.

Orientação: Cinara Ludvig Gonçalves.

Coorientação: Jade de Oliveira.

1. Transtorno do espectro autista. 2. Epidemiologia. 3. Comportamento. 4. Colesterol - Metabolismo. 5. Estresse oxidativo. 6. Estatinas. 7. Autismo - Fisiopatologia. I. Título.

CDD. 22. ed. 616.85882

Bibliotecária Eliziane de Lucca Alosilla - CRB 14/1101
Biblioteca Central Prof. Eurico Back - UNESC

PARECER



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC
PRÓ-REITORIA ACADÊMICA - PROACAD
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)
Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria N° 609 de 14.03.2019

PARECER

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado de Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado) reuniram-se para realizar a arguição da Tese de **DOUTORADO** apresentada pelo candidato **JAIME LIN**, sob o título “**O TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA COMO UM SINTOMA E NÃO UM DIAGNÓSTICO: CONSIDERAÇÕES CLÍNICAS E PRÉ-CLÍNICAS EM BUSCA DA COMPREENSÃO DO AUTISMO**” do Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.

Após haver analisado o referido trabalho e arguido o candidato, os membros são de parecer pela “**APROVAÇÃO**” da Tese.

Criciúma, SC, 25 de fevereiro de 2022.

Profa. Dra. JOSIANE BUDNI
Membro Relator – UNESC

Profa. Dra. JAQUELINE DA SILVA GENEROSO
Membro Interno – UNESC



Documento assinado digitalmente
Dirleise Colle
Data: 28/02/2022 13:54:36-0300
CPF: 049.247.559-82
Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Profa. Dra. DIRLEISE COLLE
Membro Externo – UFSC



Documento assinado digitalmente
Manuella Pinto Kaster
Data: 25/02/2022 14:59:40-0300
CPF: 037.386.789-13
Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Profa. Dra. MANUELLA PINTO KASTER
Membro Externo – UFSC

Profa. Dra. Cinara Ludvig Gonçalves
Orientadora

Prof. Dr. Emilio Luiz Streck
Coordenador do PPGCS

Prof. Dr. Emilio Luiz Streck
Coordenador do PPGCS

FOLHA INFORMATIVA

A tese foi elaborada seguindo o estilo ABNT, sendo apresentada no formato tradicional. Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Neurologia experimental e Laboratório Multiusuários do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, na Universidade do Extremo Sul Catarinense.

Dedicamos este trabalho a todas pessoas dentro do espectro do autismo e seus familiares, que com muita generosidade nos contam suas histórias, dividem suas vidas e confiam em nosso trabalho.

AGRADECIMENTOS

Tenho muitas pessoas a agradecer, muito mais do que cabem nestas páginas.

Agradeço aos meus pais, *Ho May Fu Lin* e *Shiow Shong Lin*, que, partindo de sua terra natal, cruzaram meio mundo, enfrentando, com coragem e determinação, todas as provações. A eles que, com amor e paciência, em mim plantaram os valores, regaram as virtudes e podaram os vícios, permitindo-me crescer até aqui. Muito obrigado, ainda, por me ensinarem, todos os dias, a definição de amor sacrificial.

À minha irmã, *Katia Lin*, um exemplo de amor, dedicação e resiliência, desde sempre, uma inspiração científica e profissional. Sua capacidade em conciliar família, educação dos filhos e, ainda, ser uma pesquisadora de destaque internacional, é sobre-humana!

À minha esposa, *Gigliolle Romancini de Souza Lin*. Minha fé, minha vida, minha carreira e este trabalho não seriam possíveis sem o seu amor, carinho e compreensão. É preciso, ainda, agradecer aqui, toda a ajuda com a revisão carinhosa, crítica e cuidadosa desta obra.

À minha orientadora, Prof. Dra. *Cinara Ludvig Gonçalves*, que é um exemplo de liderança, dedicação, respeito e caráter. Não tenho palavras para agradecer o carinho com que fui acolhido e orientado em seu laboratório. Que nossa amizade e parceria profissional se estendam para além deste trabalho.

Meu agradecimento sincero e especial a amiga Dra. *Letícia Burato Wessler* que desde os meus primeiros dias de pós-graduação, com uma generosidade sem igual sempre esteve presente me auxiliando e apoiando. Sem a sua amizade este e outros projetos não seriam possíveis.

Meu agradecimento e carinho aos colegas do Laboratório de Pesquisa em Autismo e Neurodesenvolvimento da Universidade do Extremo Sul Catarinense, que se dedicam, diariamente, ao estudo deste tema tão desafiador, em especial: *Maiara de Aguiar da Costa* e *Victória Linden de Rezende*, duas amigas muito especiais e que são o corpo e a alma do nosso laboratório. Aos amigos *João Victor Folle*, *Bruna de Andrade Flauzino*, *Bruna de Moraes* e *Caroline Pacheco Rodrigues*, juntos desde o início, fazendo história. Meu muito obrigado, ainda, a *Mariana Setúbal Milverstet*, *Rosiane Ronchi Nascimento Costa*, *Tamires da Silva Nascimento*, *Bruna Bittencourt Neto* e a todos os outros membros do melhor laboratório que alguém poderia desejar participar.

Aos colegas e amigos da Universidade do Sul de Santa Catarina, em especial, Dra Aline Scarlatelli Vieira Lima, cujo tamanho do conhecimento científico só é superado pela bondade do seu coração. Aos alunos e amigos da Liga Acadêmica de Neurologia (Neuroliga), Liga Acadêmica de Neurogenética e das Disciplinas de Neuropediatria. Meu obrigado especial a *Bruno de Andrade Marquette*, *Fernanda Coan Antunes*, *Larissa Siqueira*, *Thainy Corrêa Beluco* e *Vitória Bressan Pessoa*, e a tantos outros alunos especiais que nos auxiliam diariamente e tornam nossas carreiras tão gratificantes.

Gratidão especial, ainda, a *Franciani Rodrigues da Rocha*, que consegue traduzir os dados em verdades. Sem a estatística, não sairíamos do campo das suposições. Obrigado, ainda, ao amigo *Lucas Antônio Cardoso – Zion Ilustrações*, que mostra, com seus desenhos, que a arte consegue traduzir o conhecimento científico.

Gratidão especial a *Deus*, que sempre me colocou sobre ombros de gigantes e que escreve todas as linhas.

“O conhecimento é poder. Utilize parte do seu tempo para educar alguém sobre o autismo. Não necessitamos de defensores. Necessitamos de educadores”.

Asperger Women Association

“Se você conhecer uma pessoa com autismo, terá conhecido apenas uma pessoa com autismo”

Dr. Stephen Shore

“As pessoas mais interessantes irás conhecer na vida não se encaixam em caixas pré-fabricadas. Elas farão suas próprias caixas”

Dr. Temple Grandin

“Quando se trata de ter um sistema nervoso central, de sentir dor, ter fome ou sede, um rato é um homem. Tudo o que sei, aprendi com um rato”

Ingrid Newkirk

RESUMO

O termo Transtorno do Espectro Autista (TEA) refere-se à um transtorno do neurodesenvolvimento, caracterizada pela presença de dificuldades persistentes na comunicação e na interação social aliadas à um padrão restrito, repetitivo e estereotipado de comportamentos, interesses ou atividades. Se inicialmente era considerada uma condição rara, nas últimas décadas, tanto a incidência quanto a prevalência do TEA, tiveram um aumento exponencial. Como resultado, o autismo transformou-se em um problema de saúde pública emergencial e desafiador, com enormes custos emocionais e financeiros. Até o momento, todas as tentativas de se encontrar um tratamento foram frustradas pela falta de uma explicação fisiopatológica única e pela dificuldade em se encontrar até mesmo um pequeno grupo de pacientes clinicamente homogêneos. Inicialmente, 321 pacientes provenientes de um ambulatório de nível de atenção terciário foram avaliados do ponto de vista clínico (antecedentes familiares, histórico gestacional e características clínicas) e laboratorial (exames laboratoriais, exames de neuroimagem e exames de investigação neurogenética), através da avaliação clínica e revisão de prontuários médicos, comparando-se casos graves, leves e controles, na busca de padrões clinicamente relevantes. Encontrando-se 5,7 meninos para cada menina, 50,6% de história familiar positiva para transtornos neuropsiquiátricos, história de infecção materna na gestação em 29,6% dos casos, hipocolesterolemia sérica nos pacientes com TEA quando comparados aos controles. Verificou-se ainda, se o autismo poderia ser encontrado também na população geral, através da avaliação de mais de 1167 estudantes de graduação, através do questionário *Autism Spectrum Quocient*, encontrando-se uma frequência de 3,8% dos alunos apresentando sintomas compatíveis com TEA, em sua maioria das áreas de música erudita (12,5%) e engenharias (6,9%). Finalmente, após evidências de que níveis séricos baixos de colesterol eram encontrados em uma parcela significativa de pacientes com TEA, avaliou-se o uso das estatinas em um modelo animal de autismo. Animais expostos ao valproato de sódio no período pré-natal e posteriormente tratados com estatinas (atorvastatina e simvastatina) foram submetidos a testes comportamentais para a avaliação de sintomas similares ao autismo e posteriormente, tecidos de córtex cerebral e cerebelo foram utilizados para a determinação de parâmetros de estresse oxidativo, verificando-se níveis elevados de sulfidrila e TBARS que foram posteriormente revertidos com o tratamento com as estatinas, evidenciando o papel do metabolismo do colesterol na fisiopatologia do TEA e possíveis efeitos antioxidantes das estatinas. Muito mais que uma entidade diagnóstica distinta, o TEA é uma síndrome, com um conjunto de sinais e sintomas convergentes associados a uma miríade de fatores de risco genéticos e ambientais que levam a uma enorme variabilidade clínica. Levar isso em conta é fundamental quando se estuda o seu tratamento, sempre se tendo em mente qual, dos vários tipos de “autismos”, estamos tentando tratar.

Palavras-chaves: Transtorno do Espectro Autista; epidemiologia; comportamento; colesterol; estresse oxidativo; estatinas.

ABSTRACT

The term Autism Spectrum Disorder (ASD) refers to a neurodevelopmental disorder, characterized by persistent impairments in communication and social interaction allied to a restricted, repetitive and stereotyped pattern of behavior, interest or activities. If once it was considered a rare condition, in the last decades its incidence as well as prevalence presented an exponential raise. As a result, autism became an emergencial and challenging public health problem, with huge emotional and economical burdens. To date, all the efforts trying to find a treatment was frustrated by the lack of a single pathophysiological explanation and by the difficulty in gater even a small group of clinically homogeneous patients. In this study, ASD was addressed through clinical and pre-clinical strategies. Initially, 321 patients from a tertiary outpatient clinic were evaluated clinically (familial and gestational history and clinical characteristics) and through ancillary exams (laboratorial, neuroimaging and neurogenetic investigation), by interview and review of medical charts allowing the comparison of severe and mild cases with controls, in the search of clinically relevant patterns. It was found a male predominance (5,7:1), positive neuropsychiatric familial history in 50,6% of the casos, maternal infection during pregnancy in 29,6% and serum hypocholesterolemia in patients with autism when compared to controls. It was also evaluated if autism could be found in the general population, addressing 1167 undergraduate students, through the application of the Autism Spectrum Quocient. Symptoms of autism were found in 3,8% of the students, most of them from classical music courses (12,5%) and engineering (6,9%). Finally, after evidencing that low serum cholesterol levels were found in a significant number of patients with ASD, the use of statins were evaluated in an animal model of autism. Rats prenatally exposed to valproic acid and posteriorly treated with statins (atorvastatin and simvastatin) underwent behavioral tests to assess autistic-like symptoms and after, its cortical and cerebellar tissues were used for the evaluation of oxidative stress parameters were evaluated. High levels of sulfhydryl dosage and TBARS, posteriorly reverted by statin administration, stressed the role of the cholesterol metabolism in the pathophysiology of ASD and the possible antioxidant effects of statins. Much more than a single diagnostic entity, ASD is a syndrome, with a group of convergent signs and symptoms associated to a myriad of genetical and environmental risk factors that lead to an enormous clinical heterogeneity. Taking it into account is fundamental when one decides to study its treatment, always having in mind which one of the many types of “autisms” we are trying to treat.

Palavras-chaves: Autism spectrum disorder; epidemiology; behavior; cholesterol; oxidative stress

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Linha do tempo – TEA das primeiras descrições aos dias atuais	23
Figura 2. Localização geográfica do estudo	30
Figura 3. Síndrome de deleção do cromossomo 12q24.31-q24.33..	46
Figura 4. Síndrome de Phelan-McDermid. Trata-se de uma menina encaminhada para avaliação aos 5 anos de idade apresentando quadro de atraso no desenvolvimento da linguagem, dificuldades na interação social e comportamentos restritos compatíveis com o TEA.	46
Figura 5. Comparação entre as áreas de conhecimento em relação as habilidades sociais.	57
Figura 6. Comparação entre as áreas conhecimento em relação a mudança de atenção.	58
Figura 7. Comparação entre as áreas de conhecimento em relação a atenção aos detalhes..	59
Figura 8. Comparação entre as áreas de conhecimento em relação as habilidades de comunicação.	60
Figura 9. Comparação entre as áreas de conhecimento em relação a imaginação	60
Figura 10: Representação esquemática dos desenhos experimentais realizados com animais submetidos aos tratamentos com VPA, ATV e SVT..	71
Figura 11: Desenho esquemático representativo do Teste do Campo Aberto (<i>Open Field</i>), representando os parâmetros de <i>crossings</i> (A) e <i>rearings</i> (B), avaliados no teste comportamental..	73
Figura 12: Desenho esquemático representativo do Teste das Três Câmaras, representando o aparato utilizado (A), o parâmetro de socialização (B) e novidade (C), avaliados como indicativos de interação social.	74
Figura 13: Desenho esquemático representativo do Teste das bolas de gude	75
Figura 14: Efeito da exposição pré-natal ao VPA, no comportamento locomotor dos animais testados (n=12 animais/grupo).	79
Figura 15: Efeito da exposição pré-natal ao VPA e posterior tratamento com estatinas no comportamento locomotor dos animais testados (n=12 animais/grupo).	79
Figura 16: Efeito da exposição pré-natal ao VPA e posterior tratamento com estatinas no comportamento de interação social dos animais testados.	80
Figura 17: Efeito da exposição pré-natal ao VPA e posterior tratamento com estatinas, no comportamento de interação social dos animais testados..	81

Figura 18: Efeito da exposição pré-natal ao VPA e posterior tratamento com estatinas, no teste das bolas de gude.....	82
Figura 19: Efeitos da atorvastatina sobre o colesterol total em um modelo animal de autismo induzido por VPA..	83
Figura 20: Efeitos da simvastatina sobre o colesterol total em um modelo animal de autismo induzido por VPA..	83
Figura 21: Efeito da exposição pré-natal ao VPA, e posterior tratamento com estatinas (ATV e SVT), na concentração de Superóxido Dismutase (SOD), no cérebro em região de Córtex (A) e Cerebelo (B) dos animais testados (n=4-8 animais/grupo)..	85
Figura 22: Efeito da exposição pré-natal ao VPA, e posterior tratamento com estatinas (ATV e SVT), na concentração de DCF, no cérebro em região de Córtex (A) e Cerebelo (B) dos animais testados (n=4-8 animais/grupo).....	86
Figura 23: Efeito da exposição pré-natal ao VPA, e posterior tratamento com estatinas (ATV e SVT) na concentração de Sulfidrila (SH) no cérebro em região de Córtex (A) e cerebelo (B) dos animais testados (n=4-8 animais/grupo).	87
Figura 24: Efeito da exposição pré-natal ao VPA, e posterior tratamento com estatinas (ATV e SVT), na concentração de TBA-RS, no cérebro em região de Córtex (A) e Cerebelo (C) dos animais testados (n=4-8 animais/grupo) expostos ao VPA (pré-natal) e a PM (pós-natal) (n=5-6 animais/grupo).	88
Figura 25: Desenho esquemático da via metabólica de biossíntese do colesterol. A.....	94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Caraterísticas epidemiológicas e fatores de risco maternos durante o período gestacional.....	35
Tabela 2. Características clínicas dos pacientes diagnosticados com TEA.....	36
Tabela 3. Resultados dos exames complementares realizados em pacientes diagnosticados com TEA.....	37
Tabela 4. Dados antropométricos e laboratoriais	38
Tabela 5. Sintomas gastrointestinais nos pacientes diagnosticados com TEA.....	39
Tabela 6. Caracterização da amostra	56
Tabela 7. Associação entre as áreas de conhecimento e sintomas sugestivos ou não de TEA.	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT – 5-hidroxitriptamina

7DHC – 7-dehidrocolesterol

AAP – *American Academy of Pediatrics*

AD – Doença de Alzheimer, do inglês *Alzheimer's Disease*

AING – Ambulatório de investigação neurogenética

AIQ – Amplitude Interquartil

AMI – Ambulatório materno infantil

AP – Afinação perfeita

APA – Associação Americana de Psiquiatria, do inglês *American Psychiatric Association*

AQ – Quociente do Espectro do Autismo, do inglês *Autism Spectrum Quocient*

AR – Afinação relativa

ASQ – Questionário de Triagem do Autismo, do inglês *Autism Screening Questionnaire*

BHE – Barreira Hemato-Encefálica

CARS – Escala de Classificação do Autismo, do inglês *Chidhood Autism Rating Scale*

CAT - Catalase

CDC – Centro de Controle de Doenças, do inglês *Center for Disease Control*

CEUA – Comitê de Ética no Uso de Animais

CGH-array – Hibridização Genômica Comparativa por *microarray*

CID-10 – Código Internacional de Doenças 10ª versão

CNV – Variações de Número de Cópias, do inglês *Copy number variants*

CT – Colesterol total

Cx – Cortex cerebral

DCFH – 2'7' dihidrofluoresceína

DHCR7 – 7-dehidrocolesterol redutase

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DSM-III – Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais, 3ª edição, do inglês *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders - 3rd edition*

DSM-III-R – Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais, 3ª edição revisada, do inglês *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders – 3rd edition – Revision*

DSM-IV – Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais, 4ª edição, do inglês *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders – 4th edition*

DSM-IV-TR – Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais, 4ª edição revisada, do inglês *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders – 4th edition – Text Revision*.

DSM-V – Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais, 5ª edição, do inglês *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders – 5th edition*.

DI – Deficiência Intelectual

DP – Desvio Padrão

EO – Estresse oxidativo

ERO – Espécies reativas de oxigênio

EUA – Estados Unidos da América

FAA – Fenótipo Ampliado do Autismo

FIV – Fertilização *in vitro*

FXS – Síndrome do X-frágil

GI – Gastrointestinal

GSH-Px – Glutathione peroxidase

HDL – Lipoproteína de alta densidade

HMG-CoA – 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA

IC – Intervalo de confiança

IMC – Índice de massa corporal

ISRS – Inibidores Seletivos de Recaptação de Serotonina

LDL – Lipoproteína de baixa densidade

M/F – Razão de casos masculinos:femininos

MCHAT – do inglês *Modified Checklist for Autism in Toddlers*

MDA - Malondialdeído

MECP2 – do inglês *Methyl Cp6 binding protein 2*

NADPH – Fosfato de Dinucleótido de Nicotinamida e Adenina, do inglês *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate*

OMS – Organização Mundial da Saúde

OR – Razão de Probabilidades, do inglês *Odds Ratio*

PD – Doença de Parkinson, do inglês *Parkinson Disease*

PNAD - Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios

RM – Ressonância Magnética

RS – Síndrome de Rett

SBP – Sociedade Brasileira de Pediatria

SA – Síndrome de Asperger

SC – Santa Catarina

SH - Sulfidrilas

SLO – Smith-Lemli-Opitz

SMAE – Sintomas Musculares Associados as Estatinas

SNC – Sistema Nervoso Central

SOD – Superóxido dismutase

SPSS – do inglês *Statistical Package for the Social Science*

TBA-RS – Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TDAH – Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade

TEA – Transtorno do Espectro Autista

TG – Triglicerídeos

THB – Transtorno do humor bipolar

TPD – Transtornos Pervasivos do Desenvolvimento

TRA – Tecnologia de Reprodução Assistida

UNISUL – Universidade do Sul de Santa Catarina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA (TEA)	17
1.2 A HISTÓRIA DO AUTISMO – DAS PRIMEIRAS DESCRIÇÕES A CLASSIFICAÇÃO ATUAL.....	18
1.3 DIFICULDADES DIAGNÓSTICAS.....	25
2 OBJETIVOS	27
2.1 OBJETIVO GERAL.....	27
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
3 PRIMEIRO CAPÍTULO – CARACTERIZAÇÃO DA COMPLEXIDADE CLÍNICA DO TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA	28
3.1 INTRODUÇÃO.....	28
3.2 METODOLOGIA.....	29
3.2.1 Local do estudo	29
3.2.2 População, instrumentos e procedimentos	30
3.2.3 Análise estatística	33
3.3 RESULTADOS	33
3.4 DISCUSSÃO	39
3.5 REFLEXOES E PERSPECTIVAS FUTURAS	49
4 SEGUNDO CAPÍTULO – AVALIAÇÃO DE SINTOMAS DE AUTISMO NA POPULAÇÃO GERAL	51
4.1 INTRODUÇÃO.....	51
4.2 METODOLOGIA.....	52
4.2.1 População, instrumentos e procedimentos	52
4.2.2 Análise estatística	54
4.3 RESULTADOS	55
4.4 DISCUSSÃO	61
4.5 REFLEXOES E PERSPECTIVAS FUTURAS	65
5 TERCEIRO CAPÍTULO – O ENVOLVIMENTO DO METABOLISMO DO COLESTEROL NA FISIOPATOLOGIA DO AUTISMO	66
5.1 INTRODUÇÃO.....	66
5.1.1 Colesterol, cérebro e neurodesenvolvimento	68
5.2 OBJETIVOS	69
5.2.1 Objetivos gerais	69

5.2.2 Objetivos específicos	69
5.3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	70
5.3.1 Aspectos éticos	70
5.3.2 Protocolo de exposição ao valproato de sódio (VPA)	70
5.3.3 Protocolo de exposição as estatinas (Atorvastatina e Sinvastatina) 71	
5.3.4 Desenho experimental	72
5.3.5 Testes comportamentais	73
5.3.5.1 Teste do campo aberto.....	73
5.3.5.2 Teste de interação social (Teste das 3 câmaras)	73
5.3.5.3 Teste das bolas de gude – <i>Marble burying</i>	75
5.3.6 Dosagem de colesterol plasmático	75
5.3.7 Estresse oxidativo	76
5.3.7.1 Atividade da Superóxido Dismutase (SOD)	76
5.3.7.2 Determinação da concentração da 2',7'-diclorofluoresceína - DCFH... 77	
5.3.7.3 Determinação da concentração de Sulfidrilas (SH).....	77
5.3.7.4 Formação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS)	77
5.3.8 Análises estatísticas	78
5.4 RESULTADOS	78
5.4.1 Avaliação comportamental	78
5.4.1.1 Avaliação de atividade locomotora no teste do campo aberto	78
5.4.1.2 Teste da Interação Social	79
5.4.1.3 Teste das bolas de gude – <i>Marble burying</i>	81
5.4.2 Dosagem dos níveis plasmáticos de colesterol	82
5.4.3 Estresse oxidativo	84
5.4.3.1 Atividade da Superóxido Dismutase (SOD) em córtex e cerebelo	84
5.4.3.2 Níveis de DCFH em córtex e cerebelo	85
5.4.3.3 Concentração de Sulfidrilas região de córtex e cerebelo	86
5.4.3.4 Medida dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) em córtex e cerebelo	87
5.5 DISCUSSÃO	88
5.5.1 Efeito das estatinas e seu possível papel no tratamento do TEA	95
5.6. REFLEXÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	99
6 CONCLUSÕES FINAIS	101
7 REFERÊNCIAS	102

ANEXO A – FORMULÁRIO ETIOLÓGICO E TCLE.....	118
ANEXO B – CRITÉRIOS DIAGNÓSTICOS PARA O TEA AO LONGO DA HISTÓRIA DE ACORDO COM O MANUAL DIAGNÓSTICO E ESTATÍSTICO DE TRANSTORNOS MENTAIS.....	122
ANEXO C – CHILDHOOD AUTISM RATING SCALE – CARS.....	131
ANEXO D – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP UNISUL (Nº 3.256.100/CAAE: 01994918.9.0000.5369).	138
ANEXO E – AUTISM SPECTRUM QUOCIENT – AQ.....	139
ANEXO F - CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP UNISUL (Nº 3.265.914/CAAE: 04701218.4.0000.5369)	143
ANEXO G - CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ EM USO DE ANIMAIS – CEUA UNESC (Nº 3.265.914/CAAE: 04701218.4.0000.5369)	144
ANEXO H – PRODUÇÃO CIENTÍFICA.....	145

1 INTRODUÇÃO

1.1 TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA (TEA)

De acordo com a Associação Americana de Psiquiatria (*American Psychiatric Association – APA*) o termo Transtorno do Espectro Autista (TEA) refere-se ao um transtorno do neurodesenvolvimento que se caracteriza pela presença de dificuldades na comunicação e interação social e pela presença de um padrão restrito e repetitivo de comportamentos, interesses e atividades. Por definição, estes sintomas são encontrados em fases precoces do desenvolvimento afetando o funcionamento diário. O termo “espectro” é utilizado, tendo-se em vista a heterogeneidade existente na apresentação clínica, na gravidade dos sintomas e no nível de funcionamento e habilidades encontradas entre as pessoas com autismo (*American Psychiatric Association, 2013*).

Como se pode observar, até o momento, ainda inexistente uma definição acerca do que seja o TEA ou o autismo. Em uma tentativa de conceituação, Kapp *et al.*, em 2013, definiram o autismo através de um acrônimo formado por duas letras “D” sendo ao mesmo tempo uma: 1) Diferença, na qual o TEA seria uma experiência solitária de não-pertencimento onde o autismo seria uma variação biológica e natural do desenvolvimento humano e as dificuldades advindas dessa diferença, resultantes da não aceitação social e da falta de infraestrutura política (Jaarsma e Welin, 2012) e também uma 2) Doença, baseado em um modelo médico que aspira uma normalização, redução dos sintomas e eliminação de condições clínicas que levem ao comprometimento funcional das atividades da vida diária, e, na ausência de marcadores biológicos essa anormalidade se define a partir de um desvio do comportamento médio encontrado na população geral (Anckarsater, 2010).

Enquanto não se define o que seja o TEA, observou-se nos últimos anos um aumento drástico nas taxas de prevalência do autismo. Em 2012, estimativas apontavam que existiam cerca de 52 milhões de casos ao redor do globo, perfazendo uma prevalência de 1 caso para cada 132 habitantes (75 casos para cada 10.000) (Baxter *et al.*, 2015). Já em 2020, em seu último levantamento, o Centro de Controle de Doenças (*Center for Disease Control – CDC*) dos Estados Unidos da América (EUA) encontrou uma prevalência de 1 caso para cada 44 crianças (227 casos para cada 10.000 crianças), tornando o autismo a uma das condições mais comuns a afetar o neuro-desenvolvimento na faixa etária pediátrica (Maenner *et al.*, 2021).

No Brasil, os estudos de prevalência são escassos. Em um estudo piloto conduzido por Paula *et al.* (2011) encontrou uma prevalência no país de 30 casos para cada 10.000 crianças. Considerou-se, na época, como fatores relacionados a baixa prevalência, falhas na identificação adequada dos casos, a baixa qualidade dos registros médicos e a dificuldade de acesso da grande maioria da população aos recursos de saúde.

No Estado de Santa Catarina (SC), duas teses de mestrado conduzidas por Ferreira (2008) e Beck (2017) se propuseram a estimar a prevalência estadual do TEA. Ambos os estudos avaliaram exclusivamente crianças com diagnóstico de autismo regularmente matriculadas em instituições de ensino dedicadas ao amparo de crianças com necessidades especiais, encontrando, respectivamente, prevalências de 1,31 casos / 10.000 pessoas e 3,94 casos / 10.000 pessoas. Novamente, considerou-se estes dados subestimados, uma vez que foram avaliados apenas crianças inseridas dentro do sistema educacional especial, entretanto, pode se observar que, nos últimos dez anos, a prevalência do autismo mais que triplicou (Beck, 2017; Ferreira, 2008).

Esse aumento significativo das taxas de prevalência tem despertado cada vez mais o interesse científico acerca do autismo. Os estudos, entretanto, encontram-se em quantidade aquém daqueles relacionados a outras condições neuropsiquiátricas. Parte dessa dificuldade em se investigar o TEA reside na sua enorme complexidade clínica, consequência da ampla variabilidade individual, baseada na presença de sintomas específicos, graus variáveis de deficiência intelectual e associação a diversos outros transtornos neuropsiquiátricos que impossibilitam, muitas vezes, a obtenção de uma amostra homogênea de pacientes (Thurm e Swedo, 2012).

A fim de se compreender os aspectos que levaram o TEA de uma condição considerada extremamente rara até os patamares modernos, faz-se necessário conhecer um pouco acerca da história do autismo.

1.2 A HISTÓRIA DO AUTISMO – DAS PRIMEIRAS DESCRIÇÕES A CLASSIFICAÇÃO ATUAL

O primeiro caso apresentado do que viria a ser chamado de TEA foi de Donald Triplet com quatro anos incompletos, masculino, branco, nascido em 8 de setembro de 1933, filho de pais não consanguíneos, sem história de intercorrências gestacionais ou de parto. Apresentou desenvolvimento neurológico normal, tendo atingido os marcos do

desenvolvimento (sentar, andar e falar as primeiras palavras em idade adequada). Segundo informou a mãe, a medida que seu filho crescia, os momentos de conexão iam se tornando cada vez mais raros, perdendo o contato visual passando a olhar em direções aleatórias, tendo cada vez menos interesse no ambiente ao seu redor e ficando violento sempre que era interrompido em suas atividades, quer estivesse fazendo movimentos ininteligíveis com as mãos, quer estivesse girando objetos no chão (Donovan e Zucker, 2016).

Na década de 1930, Leo Kanner (1894 – 1981) era considerado o melhor psiquiatra infantil dos EUA e seu livro, *Child Psychiatry* escrito em 1935, foi considerado o manual padrão sobre o tema. Imigrando da Áustria e contratado pelo hospital Johns Hopkins, tinha como tarefa a união da psiquiatria com a pediatria, tendo em 1943 publicado o artigo *Autistic Disturbances of Affective Contact* onde descrevia o caso de Donald Triplet e de mais 10 crianças que similarmente não nasceram com habilidade sociais, apresentavam resistência a mudanças de rotina, apresentavam distúrbios na fala e estes sintomas todos apareceram em fases precoces do desenvolvimento. Os casos receberam o diagnóstico de “Distúrbio Autista do Contato Afetivo” (Kanner e Eisenberg, 1957).

Durante certo tempo, esse termo foi fonte de confusão uma vez que se relacionada a esquizofrenia, um rótulo amplamente aceito de uma doença mental que incluía alucinações, pensamento desordenado e um relacionamento exclusivo com uma realidade interior. Em 1910 a expressão “pensamento autístico” era utilizado para descrever esse tipo de comportamento (Bleuer, 1912).

Várias características, no entanto, permitiram que as duas condições fossem diferenciadas. Crianças diagnosticadas com esquizofrenia, não apresentavam um início tão precoce dos sintomas, muitas vezes apresentando um desenvolvimento neurológico normal até os 10 anos de idade. Além disso, as alucinações, sintomas característicos da esquizofrenia, não foram encontradas nas crianças descritas por Kanner. Finalmente, a história familiar também era diferente nos dois grupos, sendo que a presença de antecedentes familiares de psicose eram muito mais frequentemente encontrados nas crianças posteriormente diagnosticadas com esquizofrenia. Assim, o autismo acabou sendo considerado um diagnóstico independente (Eisenberg e Kanner, 1956).

Quase que simultaneamente, Hans Asperger (1906 – 1980) em 1944 descreveu na Europa, um grupo de oito crianças que demonstravam um déficit na interação social, habilidades inapropriadas de comunicação, um padrão restrito de interesses e uma série de características clínicas sutis que dificultavam a precisa caracterização do quadro, no que

posteriormente, foi descrito como Síndrome de Asperger (SA) (Barahona-Correa e Filipe, 2015).

A história do autismo e da SA é repleta de coincidências. Ambas as condições foram descritas por médicos provenientes da cidade de Viena na Áustria e ambos usaram o termo “autístico” para descrever um grupo de crianças que compartilhavam o comprometimento na interação social e a presença de um padrão rígido, restrito e repetitivo de interesses e comportamentos. Além disso, ambos os autores tomaram de empréstimo o termo “pensamento autístico” utilizado por Eugen Bleuler (1857 – 1939) para descrever o extremo isolamento social e emocional encontrado em pacientes com esquizofrenia. Finalmente, tanto Kanner quanto Asperger utilizaram argumentos extremamente similares (idade de início do quadro, ausência de alucinações e diferenças na história familiar) para diferenciar suas novas síndromes da esquizofrenia (Kanner, 1943; Asperger, 1944).

Diferentemente, no entanto, Hans Asperger não fez nenhuma tentativa em definir os critérios diagnósticos de uma síndrome, muito pelo contrário, procurava enfatizar os aspectos positivos que embora sutis, encontrava em seus pacientes como pensamentos repletos de originalidade e elevados níveis de interesse intelectual. Acreditava ainda que as dificuldades de interação social não se deviam a uma incapacidade em si e demonstravam, na verdade, uma forma disfuncional e inapropriada de se tentar interagir socialmente (Klin, 2003).

Talvez pelo fato do trabalho de Hans Asperger não ter sido escrito em língua inglesa, seu trabalho permaneceu virtualmente desconhecido pela sociedade científica internacional até o ano de 1981 quando chamou a atenção de Lorna Wing (1928 – 2014). Em seu trabalho, utilizou o termo SA para descrever um grupo de crianças que, de acordo com a descrição original de Hans Asperger, caracterizavam-se por isolamento e falta de reciprocidade social, aquisição normal da linguagem e presença de anormalidades sutis na comunicação verbal e não-verbal (Wing, 1981).

Dessa forma, a visão proposta por Leo Kanner foi dominante nas primeiras décadas e moldou o conhecimento posterior acerca do autismo. Uma noção de que o autismo era uma condição extremamente rara, de critérios diagnósticos extremamente rígidos apesar de subjetivos e de etiologia emocional, causada pelo inadequado cuidado parental, especialmente proveniente das mães. Em suas observações, Kanner notou que os pais de seus pacientes apresentavam uma característica que os unia: todos eram extremamente bem sucedidos financeiramente, perfeccionistas, determinados e, a seu ver, demonstravam pouco senso de

humor. Assim, sugeriu que o distanciamento emocional, especialmente proporcionado pelas mães, seria a causa do autismo (Mesibov *et al.*, 2000).

Esta noção etiológica ganhou eco e popularidade pelo psiquiatra Bruno Bettelheim (1903 – 1990). Tendo sido o principal proponente da teoria psicanalítica como causa do autismo, argumentou que a falta de um adequado estímulo emocional em fases precoces do desenvolvimento danificariam o sistema nervoso central (SNC), afetando o desenvolvimento do ego e o funcionamento intelectual. Para ele, a única forma de se tratar o autismo seria afastar as crianças de suas “mães geladeira” que com a sua falta de “calor emocional” privariam as crianças do acesso a experiências emocionais positivas e gerariam uma “defesa autística” (Bettelheim, 1972).

As observações, entretanto, de que muitas crianças autistas apresentavam irmãos absolutamente normais e que centenas de casais tão bem sucedidos, perfeccionistas e determinados tivessem filhos absolutamente saudáveis levou a se aventar a possibilidade de que o autismo fosse uma condição de bases neurobiológicas (Rimland, 1964).

Estudos posteriores comprovaram que os pais de crianças com autismo apresentavam tantas relações interpessoais e demonstravam tanto “calor emocional” e sociabilidade quanto qualquer casal da época chegando-se a conclusão de que não existiam diferenças no padrão emocional, traços de personalidade ou interação pais-filhos nas famílias com crianças autistas, terminando por absolver centenas de mães de toda a culpa (Mcadoo e Demyer, 1978).

A medida que as crianças foram sendo acompanhadas, observou-se que as mesmas apresentavam características clínicas distintas como uma maior propensão a crises epiléticas sugerindo uma alteração na estrutura cerebral (Volkmar e Nelson, 1990). Além disso, os primeiros estudos avaliando gêmeos com autismo sugeriram a presença de uma base genética para a condição (Folstein e Rutter, 1977).

Se o autismo era então uma condição neurobiológica em sua origem, ele seria passível de tratamento e eventualmente cura (Bartak e Rutter, 1973) mas para isso, ele deveria ser objetivamente diagnosticado. Michael Llewellyn Rutter (1933 - 2021) considerado o primeiro professor da cadeira de psiquiatria infantil do Reino Unido foi um dos pioneiros em propor um consenso diagnóstico formal para o autismo. De acordo com seu modelo, as dificuldades teriam que estar presentes em idade precoce e deveriam incluir problemas sociais marcantes (não apenas atraso cognitivo), dificuldades no desenvolvimento da linguagem ou ausência da fala, presença de comportamentos inadequados, rigidez emocional caracterizada

pela resistência a mudança e fixação por rotina e hiper ou hiporresponsividade ao ambiente (Rutter, 1978).

Essa proposta de um manual diagnóstico culminou com a inclusão em 1980 do “autismo infantil” como um diagnóstico reconhecido no Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais em sua terceira edição (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders 3rd edition – DSM-III*). A fim de enfatizar o caráter único deste novo diagnóstico um novo termo foi criado: autismo infantil (Spitzer e Cantwell, 1980).

Uma extensa revisão dos critérios diagnósticos para o autismo foi proposta em 1987, criando-se o termo “transtorno autístico” em lugar do autismo infantil e enfatizando-se o caráter evolutivo da doença, não se limitando ao período infantil precoce, sendo que algumas alterações foram vistas como imediatamente observadas como a alteração do termo “autismo infantil” por “transtorno autístico” refletindo o caráter crônico da condição, o número de critérios foi substancialmente aumentado permitindo a inclusão de um repertório maior de manifestações clínicas, a faixa de idade do início dos sintomas foi ampliada e o termo “transtorno pervasivo do desenvolvimento” foi introduzido para a inclusão daqueles casos em que os 8 critérios diagnósticos obrigatórios não foram integralmente preenchidos aumentando sobremaneira o número de casos diagnosticados (Szatmari, 1992).

As críticas a esse sistema de classificação vieram justamente devido à falta de um limiar no qual se basear para considerar um sintoma positivo e a inclusão de diagnósticos “subliminares” (quando se suspeitava fortemente do diagnóstico de transtorno autístico, porém não se preenchia integralmente os 8 critérios obrigatórios). Essa falta de especificidade tornava difícil a sua aplicação em ambientes de pesquisa, enquanto que sistemas de classificação excessivamente específicos toram difícil a aplicação em ambiente clínico e no planejamento de políticas públicas de saúde (Volkmar *et al.*, 2012).

O Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais em sua quarta edição (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders 4th edition – DSM-IV*), publicado em 1994 e sua versão revisada publicada em 2000 pela APA teve a intenção de ser aplicável tanto no meio clínico quanto no científico, aproximando-se do Código Internacional de Doenças em sua 10ª versão (CID-10) editado pela Organização Mundial de Saúde (OMS). O CID-10, do ponto de vista da pesquisa tinha a vantagem de ser muito mais detalhado e suas diferenças existentes entre ambas as classificações dificultavam a interpretação de dados entre os diferentes países, impedindo a colaboração internacional (Volkmar *et al.*, 1992). A seguir, encontra-se a linha do tempo, com os principais marcos históricos do TEA (figura 1).

Finalmente, via-se a necessidade de se incorporar alguns diagnósticos descritos ao longo do tempo como a Síndrome de Rett (Gillberg, 1994), a SA (Szatmari, 1991), e a psicose desintegrativa de Heller que foram denominados Transtornos Pervasivos do Desenvolvimento (TPD) (Volkmar, 1992).

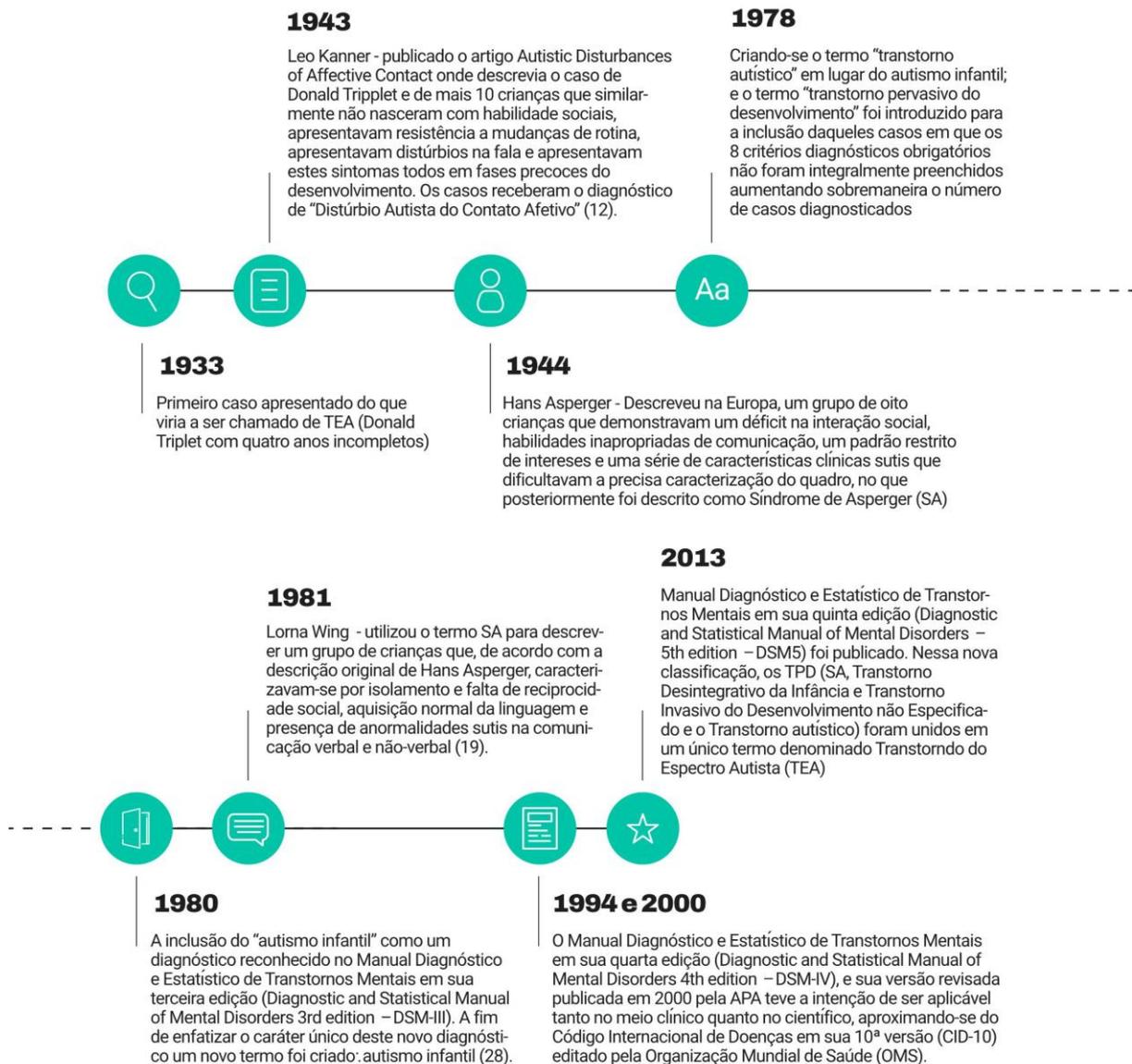


Figura 1: Linha do tempo – TEA das primeiras descrições aos dias atuais. Fonte: do autor

Longe de ser perfeita, a classificação do DSM-IV, no que se refere ao transtorno autístico, recebeu críticas desde a sua publicação. Uma das principais preocupações residia quando a validade dos diagnósticos descritos genericamente como TPD, uma vez que exceto a Síndrome de Rett, posteriormente caracterizada geneticamente, todos os outros subtipos careciam de um rigor diagnóstico (Mayes e Calhoun, 2001).

No caso da SA, por exemplo, seu diagnóstico diferencial com o autismo sempre se mostrou extremamente difícil, uma vez que em muitas ocasiões, são clinicamente indistinguíveis. Tentativas de se criar métodos de diferenciação sempre acabavam por recair sobre as diferenças no perfil neuropsicológico, história familiar ou ainda a presença de comorbidades psiquiátricas. Assim, o diagnóstico da SA sempre se mostrou inconsistente (Klin *et al.*, 2005).

Outro exemplo é o Transtorno Desintegrativo da Infância, cujo critério diagnóstico exigia um desenvolvimento aparentemente normal até os dois anos de idade. Nesse caso, a preocupação recaía no grau de confiabilidade dos relatos dos familiares quanto ao desenvolvimento neurológico normal e sua posterior regressão (Jones e Campbell, 2010). Em estudo realizado por Siperstein e Volkmar em 2004, avaliando-se uma amostra de 573 pacientes com atraso no desenvolvimento, em cerca de 20% dos casos, os pais haviam relatado um desenvolvimento neurológico inicialmente normal, entretanto, em apenas uma pequena fração destes casos, pode-se comprovar realmente a existência da regressão posterior do desenvolvimento (Siperstein e Volkmar, 2004).

Assim, em maio de 2013 o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais em sua quinta edição (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders – 5th edition – DSM5*) foi publicado. Nessa nova classificação, os TPD (SA, Transtorno Desintegrativo da Infância e Transtorno Invasivo do Desenvolvimento não Especificado e o Transtorno autístico) foram unidos em um único termo denominado Transtorno do Espectro Autista (TEA) (American Psychiatric Association, 2013).

Além disso, a tríade de sintomas que abrangia o comprometimento na interação social, comunicação e presença de comportamentos restritos e repetitivos foram reduzidos a dois domínios, preservando a presença de comportamentos restritos e repetitivos porém unindo o comprometimento da interação social e da comunicação em um só critério (American Psychiatric Association, 2013).

Dessa forma, atualmente o diagnóstico de TEA é realizado através de avaliação clínica interdisciplinar com base nos critérios clínicos descritos no DSM-V aliados a questionários e instrumentos estruturados que auxiliam no processo de avaliação da presença dos sintomas (Lord *et al.*, 2018).

No Anexo A encontram-se os critérios diagnósticos para o TEA ao longo da história de acordo com o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais.

1.3 DIFICULDADES DIAGNÓSTICAS

O TEA passou a ser mencionado quase que diariamente na mídia, em geral, nem sempre da forma mais realista e acurada, resultando em um aumento da atenção acerca do autismo, maior demanda por políticas públicas e pressão crescente na busca de verbas para tratamentos e implantação de centros especializados. Do outro lado, profissionais das diversas áreas da saúde e pesquisadores buscam métodos acurados objetivando a realização de um diagnóstico cada vez mais precoce e tratamentos mais específicos e eficazes (Lord e Bishop, 2015).

A introdução dos critérios diagnósticos contidos no DSM5 publicado em 2013 teve como objetivo tornar o diagnóstico do TEA mais direto, evitando a divisão em subtipos e unindo-os em um único termo e admitindo que o TEA pode ser acompanhado por diversas condições genéticas (por exemplo, a síndrome do X-frágil) e condições neuropsiquiátricas (por exemplo, a epilepsia, a paralisia cerebral ou o transtorno de déficit de atenção ou hiperatividade) (Hodges *et al.*, 2020).

Como toda construção humana, critérios diagnósticos podem apresentar falhas. Uma das preocupações tem sido o aumento no número de diagnósticos. Observou-se que de 1988 a 2010 o número de casos multiplicou-se em cerca de 10 vezes (Baxter *et al.*, 2015), apresentando um novo aumento nas taxas de prevalência após a publicação do DSM5 chegando aos níveis atuais. Estimativas apontam que é possível que se chegue a até um caso em cada cinco crianças por volta do ano de 2035-2040 (Maenner *et al.*, 2020).

Era esperado que, com a supressão dos subtipos de autismo e sua incorporação em torno de um diagnóstico único resultasse em um aumento no número de casos, assim como era esperado, também que o número de casos aumentasse com o aumento do conhecimento médico, a disseminação destes conhecimentos e maior preocupação de pais, famílias e o público em geral a respeito do TEA (Zablotsky *et al.*, 2015).

O principal objetivo da atualização da DSM5 foi oferecer critérios que, da forma mais acurada possível, refletissem toda a variedade de manifestações observadas pelos clínicos, nas diversas faixas etárias e variados níveis de comprometimento intelectual e de linguagem apresentados pelos pacientes (Lord e Bishop, 2015).

O uso de listas de critérios diagnósticos leva a alguns questionamentos. Alguns indivíduos diagnosticados com TEA experimentam significativo comprometimento clínico e social, enquanto outros vêm seu comportamento mais como um traço de personalidade ou

mesmo um estilo de vida e podem desejar evitar o estigma associado ao selo diagnóstico (Rutter, 2011). Além disso, um sistema de classificação não consegue contemplar a influência exercida pelo desenvolvimento neurológico sobre as manifestações clínicas ao longo do tempo. É possível que uma criança preencha os critérios diagnósticos em fases mais precoces do seu desenvolvimento, mas que, ao longo do tempo, os sinais se tornem mais brandos levando a questão de se manter ou não o diagnóstico (Rutter, 2011). Finalmente, se em doenças que apresentam um único fator etiológico como doenças hereditárias monogênicas, uma grande heterogeneidade clínica já pode ser encontrada, o que dizer do TEA que possui dezenas de fatores de risco, causas e comorbidades associadas (Volkmar e Mcpartland, 2014)?

O TEA é uma condição cujo reconhecimento está em constante evolução, e para tanto, se mostra fundamental se questionar o que é afinal o autismo? Uma doença diagnosticável ou um sintoma?

Doença, por definição é uma condição anormal particular que afeta a estrutura ou o funcionamento de todo ou de uma parte do organismo comprometendo negativamente a performance biológica típica (Lewens e Mcmillan, 2004). Já um sintoma ou sinal, podem ser definidos como uma manifestação subjetiva, observável ou mensurável em um indivíduo não estando intrinsecamente associado a uma doença (Malterud *et al.*, 2015).

Talvez seja impossível se chegar a uma conclusão definitiva acerca do TEA, entretanto, essa tese objetiva demonstrar através de dados clínicos e pré-clínicos que o autismo se aproxima, por definição, muito mais de um sintoma que um diagnóstico. Com base nos conhecimentos científicos atuais, o TEA caracteriza indivíduos que apresentam dificuldades na comunicação e na interação social associados a um padrão restrito e repetitivo de comportamentos, interesses e atividades. Indivíduos dentro do espectro do autismo se apresentam individualmente de formas únicas e diversas, podendo ser encontradas todas as faixas de desenvolvimento cognitivo (da deficiência intelectual grave até a superdotação). Não possui ainda uma causa definida e encontra-se associada a diversas comorbidades clínicas como alterações comportamentais, transtornos psiquiátricos ou comprometimentos neurológicos, responsáveis pela maior parte do déficit funcional do indivíduo. Finalmente, dado o exposto, o TEA ainda não pode ser definido como uma doença.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar através de dados clínicos e pré-clínicos, se o TEA pode apresentar-se como um sintoma, uma manifestação subjetiva do indivíduo ou manifestação observável por terceiros.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Estes dados serão apresentados nos três capítulos a seguir.

1. Evidenciar, com base na avaliação epidemiológica, clínica, análise de registros médicos e exames complementares, a heterogeneidade e complexidade clínica do autismo;
2. Demonstrar, através da avaliação de indivíduos da população geral, que o TEA e suas manifestações clínicas não estão obrigatoriamente associadas a um comprometimento e limitação funcional;
3. Caracterizar, por meio de estudos pré-clínicos um modelo animal de TEA as manifestações observáveis clinicamente no autismo, demonstrando ainda o envolvimento do metabolismo do colesterol na fisiopatologia do autismo.

3 PRIMEIRO CAPÍTULO – CARACTERIZAÇÃO DA COMPLEXIDADE CLÍNICA DO TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA

3.1 INTRODUÇÃO

Como descrito anteriormente, o TEA é um termo médico que descreve um amplo espectro de alterações do neurodesenvolvimento caracterizada por comprometimento na comunicação e na interação social associada a presença de comportamentos e interesses restritos e repetitivos (Hodges *et al.*, 2020). Embora seja uma condição cada vez mais divulgada e pesquisada, o TEA ainda não possui nenhum marcador biológico que permita a sua confirmação diagnóstica, sendo atualmente definido como um espectro clínico cujo comprometimento varia de leve a grave. O diagnóstico é totalmente baseado na observação clínica, avaliação interdisciplinar e questionários estruturados desenvolvidos de acordo com os critérios diagnósticos vigentes (Lord *et al.*, 2018).

Assim como outros transtornos neuropsiquiátricos e transtornos com comprometimento intelectual, o TEA apresenta uma ocorrência mundial, infelizmente, em países ainda em desenvolvimento e com maiores desigualdades socioeconômicas, existe uma carência de estudos e, conseqüentemente, de informações que permitam um melhor planejamento de políticas públicas assistenciais (Samadi e Mcconkey, 2011).

Diversas razões podem justificar a falta de dados epidemiológicos acerca do TEA em países em desenvolvimento: em primeiro lugar, vários países não registram ativamente e de forma sistemáticas os dados relacionados aos indivíduos com autismo; além disso, nem todos os países dispõem de recursos humanos e financeiros para disponibilizar centros especializados para o adequado diagnóstico e tratamento do TEA e, finalmente, em muitos países, ainda existe um grande estigma cercando este diagnóstico, fazendo com que muitas famílias retardem a busca de assistência clínica adequada (Fombonne, 2009).

Foram justamente estes motivos, as falhas na identificação adequada dos casos, a baixa qualidade dos registros médicos e a dificuldade de acesso da grande maioria da população aos recursos de saúde, que justificaram a baixa prevalência de TEA em um dos únicos estudos conduzidos no Brasil (Paula *et al.*, 2011).

No Brasil, um país de proporções continentais, é esperado que exista uma ampla variedade nas taxas de prevalência e também nas características clínicas apresentadas pelos indivíduos com diagnóstico de TEA. O país possui uma área superior a 8,5 milhões de

quilômetros quadrados e mais de 208 milhões de habitantes sendo considerado o quinto maior país em território e sexto em tamanho populacional. Espalha-se de leste a oeste abrangendo quatro fusos horários e seis subtipos climáticos (Instituto Brasileiro De Geografia E Estatística, 2020a).

Dados de frequência e caracterização sociodemográfica e clínica são fundamentais para formar a base de informações necessárias para o planejamento e instituição de políticas públicas voltadas para a população no espectro do autismo. Com aumento anual no número de diagnósticos existe uma necessidade crescente de clínicos capacitados para a realização do diagnóstico adequado, instituições de tratamento e escolas adaptadas, além de fonoaudiólogos, terapeutas ocupacionais e psicólogos especializados. Estudos recentes ressaltam a importância do diagnóstico precoce e da individualização dos programas de tratamento (Dawson e Gernsbacher, 2010; Fernell *et al.*, 2013; Elder *et al.*, 2017). Para se atingir estes objetivos, no entanto, o conhecimento das particularidades regionais é essencial. Este capítulo, tem como objetivo explorar as características sociodemográficas e clínicas de pacientes com TEA atendidos em centros de atenção médica de nível terciário localizados na região sul do Estado de Santa Catarina. Acredita-se que dados epidemiológicos sejam importantes para ajudar profissionais e gestores a reconhecer o autismo como uma prioridade na saúde pública e no auxílio de planejamento de políticas públicas de auxílio.

Além disso, tendo em vista a compreensão do autismo, evidenciar a enorme complexidade e heterogeneidade clínica encontrada nos mais diversos pacientes pode ser o primeiro passo em direção a teoria de que o TEA pode ser, na verdade, um sintoma e não um diagnóstico em si.

3.2 METODOLOGIA

3.2.1 Local do estudo

O Estado de Santa Catarina (figura 2) é uma das 27 unidades federativas que compõe o Brasil, localizado na região central do sul do país. É o décimo primeiro Estado em população e o vigésimo em área territorial. De forma geograficamente mais específica, situa-se entre os paralelos 25°57'41" e 29°23'55" de latitude sul e entre os meridianos 48°19'37" e 53°50'00" de longitude oeste, localizando-se em uma zona climática temperada (Governo De Santa Catarina, 2020). Encontra-se ainda dividido em 295 municípios separados em 7 regiões

demográficas. A sua porção sul compreende 46 cidades com uma população atual de 1.014.457 habitantes de herança predominantemente alemã, italiana e portuguesa (Instituto Brasileiro De Geografia E Estatística, 2020b).

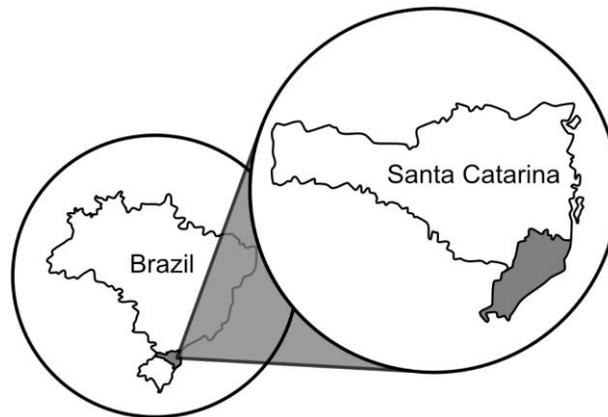


Figura 2. Localização geográfica do estudo: O Estado de Santa Catarina constitui o sétimo menor estado da federação e o décimo primeiro em população. A sua porção sul, destacada no mapa compreende 46 municípios e denomina-se mesorregião sul. O ambulatório de investigação neurogenética (AING) localizado no Ambulatório Materno Infantil (AMI) da Universidade do Sul de Santa Catarina, onde o estudo foi realizado, serve como centro de referência em investigação neurogenética para todas as cidades da mesorregião sul catarinense. Fonte: do autor.

O presente estudo foi realizado em um ambulatório de neuropediatria de nível de atenção terciário localizado no Ambulatório Materno Infantil (AMI), pertencente a Universidade do Sul de Santa Catarina (UNISUL) denominado Ambulatório de Investigação Neurogenética (AING). Tendo iniciado suas atividades no ano de 2010, tem como objetivo servir como centro de referência, público, para avaliação de transtornos do neurodesenvolvimento e queixas neurológicas, que necessitem de atenção clínica de nível terciário de complexidade, para todos os municípios que compõe a mesorregião sul catarinense.

3.2.2 População, instrumentos e procedimentos

O AING iniciou suas atividades no ano de 2010 e desde então recebe, anualmente, cerca de 200 pacientes pediátricos encaminhados por queixas neurológicas com idades de 0 a 18 anos. Cada criança é atendida por um médico neuropediatra ou psiquiatra infantil, contando ainda médico geneticista e equipe interdisciplinar de apoio (serviço de psicologia, fisioterapia e fonoaudiologia).

Todos os pacientes atendidos são registrados, desde a sua primeira consulta, em um prontuário padronizado contendo dados sociodemográficos, história clínica familiar, história

gestacional e de parto, dados clínicos e de exame físico, resultados de exames complementares solicitados (exames laboratoriais, neurofisiológicos como eletroencefalograma ou eletroneuromiografia, de neuroimagem e exames de investigação genética).

Em relação ao TEA, especificamente, o diagnóstico foi definido de acordo com os critérios diagnósticos estabelecidos pelo DSMIV-TR (American Psychiatric Association, 2000) até o ano de 2013 e pelo DSM5 (American Psychiatric Association, 2013) nos anos subsequentes, com o auxílio de instrumentos e questionários padronizados, sendo eles os seguintes:

- *Escala para rastreamento de autismo modificada (MCHAT)*: É um instrumento de triagem traduzido e validado para o português e de uso recomendado pela SBP para avaliação de sinais de autismo em crianças de 16 a 36 meses de idade. Composto por 20 perguntas claras, com respostas sim ou não e que ao final, fornece um resultado indicando um baixo risco (0 a 2 pontos), risco moderado (3 a 7 pontos) e alto risco (8 a 20 pontos) (Robins *et al.*, 2001).
- *Questionário de Triagem de Autismo (ASQ)*: Também constitui um instrumento de triagem, desenvolvido em 1999 (Berument *et al.*, 1999) e traduzido e validado para o português em 2009 (Sato *et al.*, 2009) composto por 40 perguntas cujas respostas variam entre 0 (ausência de anormalidade) ou 1 (presença de anormalidade), sendo considerado 22 pontos como pontuação de corte para a discriminação entre autismo e outros transtornos do neurodesenvolvimento. É um questionário de triagem que permite o diagnóstico operacional de TEA baseado em três áreas de funcionamento: interação social, linguagem e comunicação e, padrões de comportamento restritos e repetitivos em indivíduos de até 17 anos 11 meses e 29 dias de idade.

Os dados referentes aos pacientes com TEA foram organizados e analisados entre os anos de 2018 e 2019 sendo eles: dados sociodemográficos (idade e sexo); história familiar de transtornos neuropsiquiátricos (deficiência intelectual, transtorno do humor bipolar, esquizofrenia e TEA) e intolerância alimentar; história gestacional (história concepcional; tabagismo, consumo de álcool, uso de substâncias ilícitas, exposição a pesticidas); histórico do parto (via de parto e idade gestacional); dados clínicos do paciente (aspectos fenotípicos dismórficos, macrocrania, crises epiléticas e epilepsia, microcefalia e sintomas gastrointestinais); dados de exame físico (dados antropométricos); resultados de exames laboratoriais solicitados no momento da primeira consulta (colesterol total e frações,

triglicerídeos, vitamina D e serotonina sérica) e; resultados de exames complementares (exames de neuroimagem e exames de investigação genética).

Todos os pacientes que receberam o diagnóstico de TEA foram ainda classificados em níveis de gravidade leve/moderado ou grave de acordo com a escala de Avaliação do Autismo na Infância, do inglês *Childhood Autism Rating Scale* (CARS), em sua versão traduzida e validada para a língua portuguesa.

O CARS é uma escala desenvolvida por Schopler, Reichler e Renner (Eaves e Milner, 1993), e traduzida e validada para uso no Brasil em 2008 (Pereira *et al.*, 2008), sendo um dos instrumentos mais utilizados na avaliação clínica de crianças autistas. Consiste em uma escala de 15 itens que auxilia na identificação de crianças com TEA e as distingue das crianças sem o diagnóstico. Sua importância reside em permitir que se diferencie o autismo leve/moderado do grave, sendo de rápido preenchimento e apropriado para uso em qualquer criança acima dos dois anos de idade. Seus itens variam em pontuação de 1 a 4 e avaliam o comportamento em domínios que normalmente se encontram afetados no TEA. Sua pontuação total varia de 15 a 60, sendo que o ponto de corte para autismo é de 30 pontos, pontuações obtidas entre 30 e 36 indicam um autismo leve/moderado e acima de 36 grave. No Anexo B encontra-se na íntegra o *Childhood Autism Rating Scale* – CARS em sua versão traduzida e validada para o português.

Como dito anteriormente, o AING pertence ao AMI, uma clínica que oferece atendimento público a população pediátrica, contando ainda com um ambulatório de puericultura e pediatria geral. A puericultura pode ser definida como o acompanhamento médico integral aliado a técnicas empregadas para assegurar o perfeito desenvolvimento físico e mental da criança desde o nascimento até a adolescência (Bonilha e Rivoredo, 2005), sem o atendimento estar obrigatoriamente vinculado a alguma queixa clínica.

Assim, durante os anos de organização e análise dos dados, foi possível o acesso a prontuários de crianças saudáveis, com a mesma faixa etária e provenientes da mesma faixa de localização sócio geográfica que foram usadas como controles. O sigilo e a confidencialidade dos dados obtidos dos pacientes e de seus familiares foram garantidos, uma vez que apenas o pesquisador principal e sua orientadora tinham acesso aos dados brutos, bem como nenhuma identificação nominal foi fornecida ao longo da execução do projeto.

Previamente a sua execução, o estudo foi submetido e aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da UNISUL (nº 3.256.100/CAAE: 01994918.9.0000.5369) (Anexo C).

3.2.3 Análise estatística

Os dados foram analisados utilizando-se o programa *Statistical Package for the Social Science* (SPSS) em sua versão 21.0 (Ibm Corporation, 2012). As variáveis categóricas foram expressas em frequência e porcentagem, média e desvio padrão (DP) enquanto que as variáveis contínuas foram descritas em média e DP ou medianas e faixas de interquartis. Dados perdidos foram excluídos, a razão de probabilidade (*Odds Ratio* – OR) com 95% de intervalo de confiança (IC) foram reportados e o nível de significância estatística foi ajustado em $p < 0,05$.

O teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado com o objetivo de se determinar se os dados apresentavam uma distribuição normal. Para análise descritiva adicional das variáveis quantitativas comparações pareadas entre os grupos foram realizadas utilizando-se o teste de Mann-Whitney U bem como múltiplas comparações entre os grupos foram realizadas utilizando-se o teste de Kruskal-Wallis. O teste de Dunn foi utilizado para análise *post hoc* em pares. A fim de se analisar a associação entre as variáveis quantitativas, os testes estatísticos de Fischer, Chi-quadrado de Pearson e razão de verossimilhança foram realizados.

Uma análise de regressão logística foi realizada a fim de se investigar a relação entre os níveis de biomarcadores laboratoriais e a severidade dos sintomas de autismo sempre que fossem encontradas diferenças significativas na análise univariada.

3.3 RESULTADOS

Um total, 321 pacientes com diagnóstico de TEA foram avaliados. Os dados sociodemográficos e clínicos, história clínica familiar, gestacional e de parto, comparando-se os casos de autismo leve/moderado com os casos graves são demonstrados na tabela 1.

Houve uma predominância do sexo masculino (razão de casos masculinos e femininos de 5,7:1), sendo que de acordo com a classificação em nível de gravidade, 163 (50,7%) foram considerados leves/moderados, enquanto que 158 (49,3%) foram considerados pacientes graves. De modo geral, a idade de admissão a clínica de atenção pediátrica de nível terciário variou de um a 18 anos com uma média de $7,4 \pm 3,93$ anos de idade, tendo os casos mais graves uma idade significativamente menor no momento da admissão quando comparados aos casos leves/moderados (Tabela 1).

Considerando os casos de TEA, tanto nos casos leves/moderados quanto graves, mais de 50% dos familiares reportaram antecedentes clínicos de comprometimento da saúde mental apresentando histórico de transtornos psiquiátricos, como o transtorno do humor bipolar ou esquizofrenia. Relatos familiares significativos de deficiência intelectual (46,7%) e TEA (34%) também foram reportados. Em relação a sintomas familiares de intolerância alimentar, esta foi relatada em 11,2% das mães e 8,4% dos pais (Tabela 1).

Considerando a história concepcional, gestacional e de parto, a idade materna média no momento do parto foi de $28,22 \pm 6,5$ anos enquanto a idade paterna teve média de $31,76 \pm 7,9$ anos, com história de uso de alguma tecnologia de reprodução assistida em 3,7% dos casos e fertilização *in vitro* em 1,5%. Avançando pela história gestacional, houve registros de infecção materna em 29,6% dos casos durante o período gestacional sendo em sua grande maioria, casos de infecção urinária (96,8%), levando ao uso de antibióticos em quase 91% destes casos. Outras medicações ou substâncias utilizadas durante a gestação foram: medicações antidepressivas (6,9%); anticonvulsivantes (1,5%); cigarro (6,2%); álcool (4,6%); exposição a pesticidas agrícolas (1,6%) e uso de substâncias ilícitas em 2 casos. A via de parto também foi investigada, encontrando-se 67,6% de partos por via cirúrgica (cesariana) com recém-nascidos a termo em 81,3% dos casos. Dentre todos os fatores analisados, houve diferença estatisticamente significativa apenas em relação a presença de infecções gestacionais, com uma maior frequência nos casos de TEA grave quando comparados aos casos leves/moderados (Tabela 1).

Tabela 1. Características epidemiológicas e fatores de risco maternos durante o período gestacional. Os dados são referentes a idade, sexo, idade dos pais no momento do parto, fatores de risco associados, levando em conta o histórico concepcional, via de parto e idade gestacional.

	n (%), Média ± DP		Valor-p
	TEA gravidade		
	Leve/moderado n = 163	Grave n = 158	
Idade em anos	6,88 ± 4,21	5,20 ± 3,37	<0,001‡
Sexo			
Masculino	141 (86,5)	132 (83,5)	0,532†
Feminino	22 (13,5)	26 (16,5)	
Idade materna no parto	28,37 ± 6,10	28,08 ± 6,72	0,768‡
Idade paterna no parto	31,87 ± 8,06	31,65 ± 7,62	0,976‡
Fatores de risco			
História familiar			
Deficiência intelectual	70 (42,9)	80 (50,6)	0,168†
Transt. Psiquiátrico	82 (50,3)	86 (54,4)	0,460†
Transtorno bipolar	27 (16,6)	36 (22,8)	0,161†
Esquizofrenia	19 (11,7)	28 (17,7)	0,124†
TEA	54 (33,1)	54 (34,2)	0,842†
Intol. Alimentar (mãe)	14 (14,3)	22 (22,9)	0,122†
Intol. Alimentar (pai)	15 (15,3)	12 (12,5)	0,572†
Consumo de álcool	5 (3,1)	10 (6,3)	0,166†
Tabagismo	8 (4,9)	12 (7,6)	0,319†
Substâncias ilícitas	0 (0,0)	2 (1,3)	0,241††
Exposição a pesticidas	4 (2,5)	1 (0,6)	0,371††
Infecções gestacionais	38 (23,3)	57 (36,1) ^b	0,012†
Uso de antibióticos	37 (22,7)	49 (31,0)	0,093†
História concepcional			
TRA	8 (4,9)	4 (2,5)	0,262†
FIV	3 (1,8)	2 (1,3)	0,999††
Via de parto			
Cesáreo	112 (68,7)	105 (66,5)	0,721†
Vaginal	51 (31,3)	53 (33,5)	
Idade gestacional			
Termo	137 (84,0)	124 (78,5)	0,213†
Pré-termo	17 (10,4)	27 (17,1)	
Pós-data	9 (5,5)	7 (4,4)	

DP (Desvio Padrão); Transt. (Transtorno); TEA (Transtorno do Espectro Autista); Intol. (Intolerância); TRA (Tecnologia de reprodução assistida); FIV (Fertilização *in vitro*)

‡Teste Mann-Whitney U.

†Teste Chi-quadrado.

††Teste exato de Fisher.

^b Análise residual

Investigando-se as características clínicas dos pacientes com TEA, cujos dados encontram-se na tabela 2, verificou-se a presença de macrocrania em 19% dos casos, dismorfismos faciais em 12%, crises epilépticas em 13%, história progressiva de crises febris em 4,7% e microcefalia em 3% dos pacientes diagnosticados com TEA. Entre os fatores clínicos avaliados, a presença de epilepsia foi significativamente maior entre os casos graves quando comparados aos casos de autismo leve/moderados.

Tabela 2. Características clínicas dos pacientes diagnosticados com TEA. Levando em consideração os dados clínicos e a gravidade do TEA.

	n (%), Mediana (AIQ)		Valor-p
	TEA gravidade		
	Leve/moderado n = 163	Grave n = 158	
<i>Dados clínicos</i>			
<i>Macrocrania</i>	27 (16,6)	34 (21,5)	0,258 [‡]
<i>Dismorfismos</i>	14 (8,6)	24 (15,2)	0,067 [‡]
<i>Epilepsia</i>	8 (4,9)	34 (21,5) ^b	<0,001 [†]
<i>Crises febris</i>	10 (6,1)	5 (3,2)	0,207 [†]
<i>Microcefalia</i>	3 (1,8)	6 (3,8)	0,330 ^{††}

AIQ (Amplitude Interquartil); TEA (Transtorno do Espectro Autista)

[‡]Mann-Whitney U test.

[†]Chi-square test.

^{††}Fisher's exact test.

^bresidual analysis

Considerando-se os resultados dos exames de investigação complementar realizados a exemplo dos exames laboratoriais, de neuroimagem e de investigação genética, verificou-se que dos 321 casos de TEA, 109 (34%) realizaram exame de ressonância magnética (RM) de crânio resultando em 33 (30,3%) exames com resultados anormais; 117 (36,4%) dos pacientes realizaram exame de cariótipo resultando em 13 (11%) de anormalidade e 26 (8%) dos casos realizaram um exame de hibridização genômica comparativa por *microarray* (CGH-array) resultando em alterações encontradas em 16 (61,5%) dos exames realizados. Estes dados encontram-se na tabela 3, não tendo sido encontradas diferenças significativas quando comparados os casos de TEA graves com os leves/moderados.

Tabela 3. Resultados dos exames complementares realizados em pacientes diagnosticados com TEA.

	n (%)		Valor-p [†]
	TEA gravidade		
	Leve/moderado n = 163	Grave n = 158	
RM de crânio			
Normal	44 (80,0) ^b	32 (59,3)	0,018
Anormal	11 (20,0)	22 (40,7) ^b	
Não realizado	108	104	
Cariótipo			
Normal	51 (89,5)	53 (88,3)	0,844
Anormal	6 (10,5)	7 (11,7)	
Não realizado	106	98	
CGH-array			
Normal	4 (28,6)	6 (50,0)	0,263
Anormal	10 (71,4)	6 (50,0)	
Não realizado	149	146	

RM (Ressonância magnética); CGH-array (Hibridização genômica comparativa por *microarray*)

[†]Chi-square test.

^bresidual analysis

Além disso, dos 321 casos diagnosticados com TEA, em 237 deles, foi possível buscar os dados de medidas antropométricas (peso e estatura), bem como, os resultados de exames laboratoriais solicitados na primeira consulta, antes da introdução de psicofármacos (nível sérico de colesterol total, lipoproteína de baixa densidade – LDL, lipoproteína de alta densidade – HDL, triglicerídeos, vitamina D e serotonina). Estes dados, que se encontram na tabela 4, foram comparados com dados obtidos de 236 indivíduos controles pareados por idade e características sociodemográficas, revelando uma frequência de sobrepeso (10,5%) e obesidade (28,7%) entre as crianças diagnosticadas com TEA. Os pacientes com as formas mais graves de TEA apresentaram níveis mais elevados de serotonina sérica ($281,16 \pm 98,27$ ng/dL) e níveis séricos mais baixos de colesterol total ($154,32 \pm 31,96$ ng/dL), em comparação com os casos leves/moderados. Os níveis séricos de LDL, HDL, triglicerídeos e vitamina D também foram analisados, porém nenhuma diferença significativa foi encontrada entre os grupos ou com os controles.

Tabela 4. Dados antropométricos e laboratoriais dos pacientes analisados no presente estudo. São levados em consideração dados como > peso, altura, IMC, níveis plasmáticos de colesterol e suas frações, vitamina D e serotonina.

	<i>Média ± Desvio padrão, n (%)</i>			
	<i>TEA gravidade</i>			Valor-p
	Leve/moderado n = 119	Grave n = 118	Controles n = 236	
Peso (kg)	36,1 ± 23,79 ^a	25,4 ± 12,66 ^c	35,5 ± 14,67 ^d	<0,001 [‡]
Altura (cm)	128 ± 27,07 ^a	114,9 ± 20,38 ^c	135,7 ± 20,77 ^d	<0,001 [‡]
IMC (kg/cm ²)	19,8 ± 5,53	18,4 ± 3,68	18,3 ± 3,59	0,216 [‡]
Baixo peso	5 (4,2)	7 (5,9)	9 (3,8)	0,007 ^{††}
Saudável	55 (46,6)	50 (42,4)	150 (63,6) ^b	
Sobrepeso	12 (10,2)	13 (11,0)	36 (15,3)	
Obesidade	33 (28,0) ^b	35 (29,7) ^b	39 (16,5)	
CT	157,2 ± 27,07 ^{a,c}	154,3 ± 31,96 ^a	165,9 ± 38,80 ^c	0,024 [‡]
LDL	88,1 ± 25,60	87,7 ± 29,55	96,9 ± 37,07	0,125 [‡]
HDL	51,5 ± 13,03	51,3 ± 14,68	52,1 ± 14,34	0,886 [‡]
TG	82,4 ± 41,52	77,4 ± 33,04	77,8 ± 35,58	0,784 [‡]
Vit. D	31,4 ± 11,15	32,7 ± 10,45	30,9 ± 9,57	0,424 [‡]
Serotonina	167,3 ± 94,21 ^a	281,2v± 98,27 ^c	141,9 ± 64,82 ^a	<0,001 [‡]

TEA (Transtorno do espectro autista); IMC (Índice de massa corporal); CT (Colesterol total); LDL (Lipoproteína de baixa densidade); HDL (Lipoproteína de alta densidade); TG (Triglicerídeos); Vit. D (Vitamina D)

[‡]Teste de Kruskal-Wallis H em uma via.

^{a,c,d} Teste de significância entre grupos de Dunn

[†] Teste Chi-quadrado

^{††} Teste de razão de verossimilhança

^b Análise de resíduos

Questões específicas acerca de queixas ou sintomas gastrointestinais foram avaliados em 194 pacientes com diagnóstico de TEA, encontrando-se na tabela 5, resultando em uma frequência de sintomas gastrointestinais em 57,7% das crianças, sendo as queixas mais frequentes: dor abdominal (32,5%), anormalidade na consistência das fezes (31%); seletividade

alimentar (28%) e distensão abdominal (26,3%). Todos os sintomas gastrointestinais apresentaram uma frequência significativamente maior entre os casos de autismo grave quando comparados aos casos leves/moderados.

Tabela 5. Sintomas gastrointestinais nos pacientes diagnosticados com TEA e os respectivos graus de TEA.

Sintomas	n (%)		Valor-p
	TEA gravidade		
	Leve/moderado n = 98	Grave n = 96	
Gastrointestinais	31 (31,6)	81 (84,4) ^b	<0,001 [†]
Dor abdominal	15 (15,3)	48 (50,0) ^b	<0,001 [†]
Fezes anormais	9 (9,2)	51 (53,1) ^b	<0,001 [†]
Seletividade alimentar	18 (18,4)	37 (38,5) ^b	0,002 [†]
Distensão abdominal	9 (9,2)	42 (43,8) ^b	<0,001 [†]
Flatulência	10 (10,2)	39 (40,6) ^b	<0,001 [†]
Diarréia	6 (6,1)	39 (40,6) ^b	<0,001 [†]
Intolerância alimentar	17 (17,3)	27 (28,1)	0,073 [†]
Incontinência fecal	8 (8,2)	36 (37,5) ^b	<0,001 [†]
Vômitos	5 (5,1)	25 (26,0) ^b	<0,001 [†]
Tratamento dietético	9 (9,2)	18 (18,8)	0,054 [†]
Constipação	7 (7,1)	20 (20,8) ^b	0,006 [†]
Dor pós prandial	3 (3,1)	15 (15,6) ^b	0,003 ^{††}
Uso de laxantes	3 (3,1)	5 (5,2)	0,495 ^{††}
Sangue nas fezes	2 (2,0)	1 (1,0)	0,999 ^{††}
Refluxo gastroesofágico	1 (1,0)	1 (1,0)	0,999 ^{††}

[†]Chi-square test.

^{††}Fisher's exact test.

^bresidual analysis

3.4 DISCUSSÃO

Neste capítulo foi realizado um estudo epidemiológico com o objetivo de se estabelecer uma base de dados sociodemográfica, clínica e laboratoriais que representasse adequadamente os dados da região sul catarinense geográfica, demonstrando-se ainda a enorme complexidade e heterogeneidade clínica do TEA. Dados regionais que abordem as características clínicas dos pacientes diagnosticados com TEA são cruciais, uma vez que oferecem informações vitais para o planejamento de políticas públicas que direcionarão os recursos necessários ao longo da vida do indivíduo de acordo com as suas necessidades especiais, não apenas no âmbito escolar e comunitário durante a infância, mas também ao longo da adolescência e sua transição para a idade adulta (Diallo *et al.*, 2018).

O mais recente estudo de prevalência do autismo, região sul catarinense estimou, em 2017 uma prevalência de 3,94 casos de TEA para cada 10.000 pessoas (Beck, 2017). Com base nestes dados e considerando a população abaixo de 18 anos residentes em nossa região, que atualmente é de 471.760 pessoas de acordo com o último censo (Instituto Brasileiro De Geografia E Estatística, 2020b), poderia se esperar um número total de 186 casos. Devido a questões metodológicas (uma vez que o estudo realizado em 2017 considerou apenas casos diagnosticados e regularmente matriculados em alguma escola especializada para indivíduos com necessidades especiais) é possível que os dados de prevalência estejam subestimados. Desta forma, a amostra obtida no presente estudo, de 321 casos, pode ser considerada representativa da população pediátrica local e, até o momento, se desconhece publicações similares que tenham avaliado as características clínicas em uma amostra tão grande no Brasil.

Como era esperado, houve uma predominância de indivíduos do sexo masculino na amostra obtida com uma razão de casos masculinos:femininos (M/F) de 5,7:1 que pode ser considerada maior que as taxas comumente reportadas de 4:1 obtida através de grandes estudos populacionais de prevalência (Fombonne, 2009). É possível se notar, no entanto, que existe uma ampla variedade nas taxas M/F entre os diferentes estudos epidemiológicos, podendo variar de 2:1 (Fombonne *et al.*, 1997) a 8:1 (Icasiano *et al.*, 2004).

O primeiro estudo de meta-análise especificamente voltado para a avaliação da taxa M/F conduzido por Loomes *et al.* (2017) que avaliou um total de 54 estudos com uma amostra total de 13.784,284 indivíduos dos quais 53.712 apresentavam TEA, uma razão de casos M/F de 3,5:1 pode ser considerada a mais frequentemente encontrada. Igualmente variável, são as taxas de prevalência de TEA em serviços de atenção médica de nível terciário, que fornecem atendimentos de alta complexidade e/ou especializado. No presente estudo, foram encontrados 321 casos de autismo (18,9%) entre os 1700 pacientes encaminhados desde o início das atividades do AING. Esses números são muito maiores que os encontrados por Kalra *et al.* (2005) que, avaliando 4620 casos encaminhados para uma clínica de neurologia pediátrica em Nova Déli na Índia encontrou 225 casos (4,8%) de TEA. Menores, porém, que os encontrados por Clarke *et al.* (2005) que, avaliando 292 encaminhamentos para um ambulatório neuropediátrico localizado em Memphis nos EUA encontrou 92 casos (31,5%) de autismo.

Acredita-se que essas diferenças existam devido a qualidade do atendimento a nível primário, responsável pelo reconhecimento inicial e encaminhamento dos casos suspeitos. O acesso e a qualidade dos serviços médicos podem ser também a diferença entre um diagnóstico precoce ou tardio dos casos. No presente estudo, a média de idade na primeira consulta foi de

cerca de 7 anos nos casos leves/moderados e 5 anos nos casos graves, idade essa considerada avançada.

Vários fatores podem contribuir para um encaminhamento tardio e consequentemente um diagnóstico em idades mais avançadas: uma falta de conhecimento acerca do autismo pela população geral, aliada a fatores socioeconômicos que comprometem o acesso aos serviços de saúde, triagem inadequada aliada ao uso de instrumentos e questionários de baixa sensibilidade; atraso ou resposta inapropriada por parte dos profissionais da educação ou da saúde primária frente as preocupações familiares gerando dificuldades no reconhecimento do autismo, especialmente nos casos mais leves (Davidovitch *et al.*, 2015).

Corroborando com a literatura, os dados obtidos demonstraram uma presença significativa de história familiar de transtornos neuropsiquiátricos como o próprio TEA, THB, deficiência intelectual (DI) e esquizofrenia. De acordo com uma coorte populacional envolvendo mais de 550 mil indivíduos, a presença de história familiar de transtorno do humor, ansiedade, THB, DI e esquizofrenia estava relacionado a um aumento de mais de nove vezes no risco de história familiar de TEA, sendo que este risco variava de 1,5 vezes quando a história familiar era unicamente de transtorno de personalidade a 9 vezes quando existiam outros casos de TEA com DI. Estas associações diminuem a medida que o grau de parentesco se torna mais distante, entretanto, permanece significativamente associado a maiores chances de TEA em uma família mesmo naqueles com história psiquiátrica em familiares de quarta geração (Xie *et al.*, 2019).

Um outro fator de risco bem estabelecido na literatura para o TEA é a sua associação com a idade parental. De acordo com estudos populacionais, idade materna acima de 35 anos e paterna acima de 40 elevam o risco de autismo na prole (Hultman *et al.*, 2011). Este efeito parece não estar limitado apenas a idade paterna ou materna isoladamente avançadas, mas também a diferença de idade entre os genitores (Sandin *et al.*, 2016). Na casuística apresentada, no entanto, a idade parental não se apresentou como um fator de risco determinante para o surgimento do TEA ou sua gravidade.

Em relação a história concepcional em meta-análise conduzida por Liu *et al.* (2017), o uso de TRA esteve associada a um risco maior para o surgimento do TEA na prole gerada, possivelmente devido a alterações epigenéticas induzidas pela exposição hormonal, preparação e manipulação dos gametas, congelamento dos embriões, uso de meios de cultura e inseminação tardia. Considera-se TRA os métodos utilizados para se chegar a gravidez e ao nascimento de um feto através de qualquer procedimento ou medicação incluindo FIV, transferência

intrafalopiana de zigotos, de gametas e inseminação artificial, sendo que até o momento, cerca de cinco milhões de crianças, no mundo, já nasceram através destes procedimentos (Kupka *et al.*, 2014).

Na presente amostra, 12 (3,7%) das 321 crianças com diagnóstico de TEA foram concebidas por meio de TRA, em cinco (1,5%) através de FIV. Estes resultados foram similares aos reportados na literatura. Sandin *et al.* (2013) após analisar mais de 2,5 milhões de crianças nascidas na Suécia, evidenciou que 103 das 6959 crianças posteriormente diagnosticadas com TEA foram concebidas por FIV, uma porcentagem igual de 1,5%.

Na amostra estudada, foi reportado um número significativo relacionado a casos de infecção materna (29,6%) durante a gestação, representada em sua vasta maioria por casos de infecção urinária. Em 2015, Zerbo *et al.* conduziram um estudo caso-controle incluindo 407 casos de TEA e 2075 controles com o objetivo de investigar a associação entre infecção materna durante a gestação e o risco de TEA. Neste estudo, similarmente, a infecção bacteriana mais comumente associada foi a infecção do trato urinário. A frequência de infecção, entretanto, foi similar entre os dois grupos, uma vez que cerca de 50% das mães de ambos os grupos teve ao menos um episódio de infecção diagnosticada em qualquer período durante a gestação, não sendo possível encontrar uma associação entre o diagnóstico de infecção gestacional e o TEA (Zerbo *et al.*, 2015).

Todos estes fatores, uso de antibióticos durante a gestação (Hamad *et al.*, 2019), antidepressivos (Zhou *et al.*, 2018), medicações anticonvulsivantes (Gerard e Meador, 2015) e exposição a substâncias químicas ambientais como o tabaco, o álcool e pesticidas (Kalkbrenner *et al.*, 2014) já foram implicados, em algum momento, em graus variáveis e de forma inconsistente com o aumento de chance de autismo na prole. Nota-se que uma das limitações do presente projeto foi a impossibilidade de se comparar esses dados de exposição com controles normais. Foi possível apenas verificar que a exposição a estes fatores de risco não esteve relacionada a um aumento na gravidade do autismo.

Como os controles utilizados eram provenientes de uma população pediátrica saudável e assintomática, questões referentes a exposição gestacional frequentemente não eram sistematicamente questionadas, ou adequadamente registrados em prontuário ou estes dados não eram lembrados pelos informantes de forma consistente, caracterizando a presença do viés de lembrança. Em um estudo publicado por Najman *et al.* (2001) que avaliou mais de 5 mil mães e seus filhos em três momentos distintos, três a cinco dias após o nascimento, aos 6 meses e aos 5 anos de idade e verificou que mães que não vivenciaram, ao longo da vida de seus filhos,

nenhuma intercorrência clínica ou acontecimento emocionalmente impactante, apresentavam maior dificuldade em se recordar de fatos como marcos do desenvolvimento clínico. Concluiu, ainda, que esse viés de memória pode responder por até 16% das inconsistências em relatos maternos, e que essa variação pode aumentar com o passar do tempo.

Um outro aspecto avaliado nas crianças diagnosticadas com TEA foi a via de parto. Como demonstrado em uma revisão sistemática abrangendo mais de 20 milhões de partos, nascimentos por via cirúrgica (cesarianas) foram positivamente associados ao TEA e ao déficit de atenção e hiperatividade (TDAH). Estes resultados sugerem, no entanto, que a associação não se deve a via de parto em si, porém, pode estar relacionado também aos fatores que levaram a necessidade de um parto cirúrgico incluindo gestações de risco, trabalho de parto prolongado, ruptura prematuro de placenta assim como outras intercorrências clínicas que podem também estar relacionados a um maior risco de desenvolvimento do autismo na prole (Zhang *et al.*, 2019).

Nos dados apresentados, foi encontrada uma elevada frequência de partos cesarianos nos casos com TEA, entretanto, esse fato pode estar relacionado mais a um viés cultural. De acordo com dados epidemiológicos, a frequência de partos cirúrgicos tem aumentado na última década com uma prevalência geral de 56,6% dos partos no Brasil e 62,6% no Estado de Santa Catarina (Ministério Da Saúde, 2020).

Diversos aspectos podem estar associados a uma elevada prevalência de partos cesários no Brasil, como o histórico de parto cirúrgico prévio em uma mesma gestante, preferência materna (uma vez que se associa essa via de parto a menos dor e menos trauma). O sistema de saúde brasileiro, assim como fatores culturais, pode também estar relacionados a uma maior frequência desta via de parto. O acompanhamento pré-natal é geralmente realizado por um único médico e não por uma equipe interdisciplinar que poderiam orientar as mães a respeito dos riscos, benefícios e outras opções de diferentes formas de parto. Uma outra razão, ainda, pode estar relacionada a fatores econômicos uma vez que os partos vaginais necessitam de uma equipe obstétrica de plantão diuturnamente, o que é muito mais dispendioso para os serviços de saúde (De Oliveira *et al.*, 2016).

Nos dados avaliados, nem a via de parto e nem a idade gestacional no momento do parto estiveram significativamente associados a uma maior gravidade dos sintomas de TEA.

No AING, a população de crianças dentro do espectro do autismo apresentou uma taxa de 19% de macrocrania, 17,7% de epilepsia e ou histórico pregresso de crises epiléticas febris, 12% de dismorfismos faciais e 3% de microcefalia. Estas características sugerem a existência

de diferentes subtipos de autismo, também denominados de autismo sindrômico ou secundário, termo este frequentemente utilizado para se referir a casos de TEA com uma etiologia definida ou características clínicas e morfológicas distintas (Benvenuto *et al.*, 2009).

Em relação a macrocrania, estudos longitudinais retrospectivos mostram que um número significativo de crianças com TEA apresentam alterações no volume e no formato do crânio, relatando uma prevalência de 24% de macrocrania em pacientes com autismo (Fombonne *et al.*, 1999; Fidler *et al.*, 2000; Parmeggiani *et al.*, 2002). Estes dados podem ser considerados superestimados uma vez que foram baseados, assim como no projeto apresentado, em uma amostra obtida em serviço especializado de nível terciário. Em estudo avaliando mais de nove mil crianças a nível populacional, não comprovou existir uma relação entre macrocrania e o autismo (Barnard-Brak *et al.*, 2011).

Quanto a epilepsia, a taxa de quase 18% encontrada foi similar aos 16,8% (4,8% a 26,4%) encontrados em uma revisão de nove estudos avaliando a relação e autismo e epilepsia (Tuchman *et al.*, 2010). Além disso, observou-se, no presente estudo que a presença de epilepsia se relacionava positivamente a uma maior gravidade do autismo, com uma taxa de 21,5% de crises epilépticas entre os pacientes com TEA grave, em comparação com os 4,9% apresentados pelos quadros leves/moderados.

De acordo com a literatura, a epilepsia se correlaciona positivamente com a gravidade do autismo por vários motivos: pode comprometer ainda mais o desenvolvimento da linguagem, estar relacionado a comprometimentos motores e deficiência intelectual (Ewen *et al.*, 2019).

O TEA, enfim, é atualmente considerado um transtorno do neurodesenvolvimento que é frequentemente acompanhado por macrocrania, epilepsia, dismorfismos faciais e microcefalia. Em um estudo de coorte realizados com pacientes com TEA, foi encontrada uma prevalência de 12,3% de dismorfismos faciais e 4,4% de microcefalia, dados semelhantes aos encontrados aqui (Capkova *et al.*, 2019).

Com bases nestes dados, um questionamento que se faz é: a presença destas alterações clínicas e dismórficas sugerem a necessidade de realização irrestrita de exames de investigação complementar? Possivelmente não.

Nesta amostra de 321 crianças com TEA, a RM de crânio foi realizada em 109 casos, evidenciando alterações estruturais cerebrais em 30,3 dos casos, enquanto que exames de investigação genética como cariótipo foram realizados em 117 casos com alterações em 11%

e CGH-array em 26 casos com alterações descritas em 61,5% destes exames. As alterações encontradas nestes casos, também, não se correlacionaram com a gravidade do TEA.

De acordo com estudo realizado em 253 pacientes com autismo, RM estrutural de crânio foi realizada em 77 destes pacientes, evidenciando alterações em cerca de 14,5% dos casos, reiterando a noção de que a RM de crânio convencional e de rotina não é, em si, um exame complementar essencial para o diagnóstico do TEA. As alterações na estrutura cerebral podem não ser únicas nem específicas e sua realização não influencia no plano terapêutico ou prognóstico dos pacientes (Ming *et al.*, 2016).

Enquanto isso, em estudo realizado por Cop *et al.* (2015), investigando a presença de anormalidades detectáveis pelo cariótipo em uma população clínica de 96 paciente com TEA foram encontradas alterações em 9,7% dos exames. Assim como os exames de investigação por neuroimagem, nenhuma alteração encontrada pode ser considerada específica para o autismo ou determinante para o seu tratamento.

Por volta do ano 2000, técnicas de análise citogenética molecular foram introduzidas na prática médica. O microarray cromossômico (técnica de biologia molecular que permite a avaliação de ganhos e perdas cromossômicas) tornou-se rapidamente uma ferramenta importante na identificação de número de cópias variadas (*copy number variants* CNV) do ácido desoxirribonucleico (DNA). Quando estudos de microarray foram realizados em pacientes com transtornos do neurodesenvolvimento, um significativo número deles apresentou pequenas deleções ou duplicações genéticas, tornando-se um dos exames citogenéticos de maior impacto na investigação deste grupo de pacientes (Schaefer, 2016).

Nos últimos 15 anos, muitos estudos foram publicados reportando a prevalência de CNVs identificadas em pacientes com TEA através do CGH-array, tanto que, atualmente o Colégio Americano de Genética Médica recomendou recentemente o CGH-array genético de primeira linha para a avaliação de crianças com TEA (Schaefer *et al.*, 2013). Na amostra apresentada, alterações nos exames de CGH-array foram encontradas em grande parte dos poucos pacientes que conseguiram realizar o exame, o custo e a baixa disponibilidade de laboratórios capacitados para a sua realização tornam a sua execução difícil na prática clínica, sobretudo no sistema público de saúde.

A título de ilustração, a Figura 3 e a Figura 4 demonstram a complexidade do TEA e a relação dos aspectos clínicos com a realização de exames de investigação complementar.

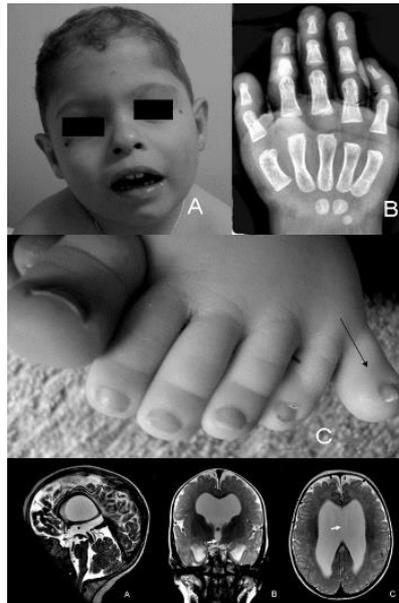


Figura 3. Síndrome de deleção do cromossomo 12q24.31-q24.33. Paciente de 3 anos de idade apresentando quadro clínico compatíveis com TEA e que apresentava quadro de baixa estatura, mal-formações faciais, alterações em dedos das mãos, polidactilia nos pés, deficiência intelectual grave e alterações estruturais cerebrais (hidrocefalia supratentorial, hipoplasia do corpo caloso, ausência do septo pelúcido e hipomielinização). O exame de CGH-array demonstrou uma deleção intersticial em heterozigose no cromossomo 12 (46, XY, del(12)(q24.31q24.33) confirmando o diagnóstico etiológico do quadro (Lin *et al.*, 2020).



Figura 4. Síndrome de Phelan-McDermid. Trata-se de uma menina encaminhada para avaliação aos 5 anos de idade apresentando quadro de atraso no desenvolvimento da linguagem, dificuldades na interação social e comportamentos restritos compatíveis com o TEA. Ao exame físico apresentava quadro de hipotonia e dismorfismos faciais discretos (dolicocefalia, ponte nasal baixa e baixa implantação das orelhas). Exames de neuroimagem normais e CGH-array que evidenciou microdeleção no cromossomo 22 na região q13.31-q13.33 confirmando o diagnóstico de Síndrome de Phelan-Mcdermid (Lin *et al.*, 2020).

Ambos os casos apresentados foram avaliados, investigados e diagnosticados no AING durante a realização deste projeto. Embora ambos tenham o diagnóstico de TEA, nitidamente são casos completamente diferentes.

Duas interessantes correlações emergiram durante a análise dos dados: 1) a relação entre os dados antropométricos de peso, estatura e IMC com o perfil lipídico da população com TEA; e 2) a hiperserotoninemia sérica como um possível biomarcador de gravidade do autismo.

Embora muitos fatores de risco relacionados a obesidade ou sobrepeso sejam os mesmos tanto para pacientes com TEA quanto para a população pediátrica geral, crianças dentro do espectro podem apresentar riscos adicionais como a seletividade alimentar, uma menor frequência na prática de atividades físicas, uso de psicofármacos que podem levar ao ganho ponderal além da presença de outras comorbidades clínicas como ansiedade, depressão, sintomas gastrointestinais ou distúrbios do sono, cada um deles com potencial predisposição ao ganho excessivo de peso (Hill *et al.*, 2015).

Na presente amostra, foi possível a comparação do estado ponderal de 236 crianças com diagnóstico de TEA (118 classificadas como leve/moderada e 118 como graves) com 236 controles saudáveis. A obesidade foi significativamente maior entre os casos com TEA comparados aos controles (16,5% nos controles saudáveis, 28% nos casos leve/moderados e 29,7% nos quadros de autismo grave). Os níveis séricos de colesterol total, entretanto, foram mais baixos nos autistas graves ($157,20 \pm 27,07$ mg/dL) quando comparados aos controles saudáveis ($165,95 \pm 38,80$ mg/dL), sendo que após tratamento estatístico, essa diferença foi considerada significativa menor.

Interessantemente, o perfil lipídico não se correlacionou positivamente ao IMC dos pacientes com TEA como se poderia supor, corroborando, no entanto, estudos prévios que indicam que a hipocolesterolemia é um aspecto comum entre pacientes com autismo (Kim *et al.*, 2010; Tierney *et al.*, 2021).

O colesterol apresenta múltiplas funções biológicas, algumas das quais poderiam contribuir para o desenvolvimento do TEA. Sabe-se que o colesterol é um conteúdo importante para a formação das membranas celulares e para a mielinização do SNC modula a função de receptores de ocitocina e participa nas vias metabólicas relacionadas a neurotransmissão serotoninérgica (Benachenhou *et al.*, 2019).

Uma outra correlação interessante encontrada na amostra foi a presença de elevados níveis de serotonina sérica ($281,16 \pm 98,27$ ng/dL) nos pacientes com TEA grave quando comparados com os casos leves/moderados ($167,34 \pm 94,21$ ng/dL) ou controles saudáveis ($141,92 \pm 64,82$ ng/dL). Aplicando-se análise de regressão univariada, verificou-se que níveis de serotonina sérica acima de 197,15 ng/dL (mediana) representam um risco 3 vezes maior de revelar um caso de autismo grave quando comparados com controles (2.49 OR IC95% 1.38-4.52) e 7 vezes maior quando comparados aos casos leves (7,2 OR IC95% 3.94-13.14).

O nível elevado de serotonina sérica (5-hidroxitriptamina ou 5-HT) pode ser considerado o primeiro biomarcador identificado nas pesquisas com o autismo, e permanece,

ainda nos dias de hoje um dos traços quantitativos mais consistentes associados ao TEA (Veenstra-Vanderweele *et al.*, 2012).

Na amostra apresentada, o nível elevado de serotonina sérica não foi apenas um biomarcador de TEA, mas também determinante de sua gravidade. De acordo com os achados do presente trabalho, um estudo comparativo conduzido por Abdulmir *et al* (2018) também encontrou uma correlação positiva entre os aumentos nos níveis de serotonina e a gravidade do autismo.

A fim de se explicar fisiopatologicamente essa relação, talvez tenha que se voltar a atenção ao sistema gastrointestinal (GI). Uma ampla variedade de sintomas GI como constipação, diarreia, distensão e dor abdominal, refluxo, vômitos, alteração no padrão e consistência das evacuações e alergias alimentares são cerca de quatro vezes mais prevalentes em crianças com TEA quando comparados com a população pediátrica saudável (Fulceri *et al.*, 2016).

Um fator que pode contribuir para a presença de distúrbios GI entre os indivíduos com TEA e a anormalidade na composição da microbiota intestinal. De acordo com a literatura, diferenças na composição de diversas espécies de microorganismos são encontradas quando se compara a microbiota intestinal de autistas com a população geral (Finegold *et al.*, 2010). Estas alterações na composição podem alterar o estado imunológico no intestino do indivíduo com autismo, levando a um quadro inflamatório que, em crianças geneticamente predispostas tornando-as mais susceptíveis a expressar um comportamento autista (De Theije *et al.*, 2011).

A relação entre alterações na microbiota intestinal e sintomas de TEA foi demonstrada por nosso grupo de pesquisa em autismo em um artigo publicado em 2020. Utilizando um modelo animal, verificou-se que uma exposição a elevadas doses de antibióticos por um período de uma semana alterou parâmetros de interação social em peixes-zebra expostos, indicando um envolvimento do eixo cérebro-intestino no comportamental social (Gonçalves *et al.*, 2020).

Como uma tentativa de se fechar o ciclo, relacionando um estado inflamatório GI, hiperserotoninemia sérica e síntese de 5-HT cerebral, uma hipótese proposta (Muller *et al.*, 2016) é a de que durante o processo de resposta inflamatória, células imunes como os mastócitos levam a um aumento no trânsito intestinal aumentando a sua secreção, vasodilatação e permeabilidade vascular. Isto, termina por levar a distúrbios na motilidade intestinal, alteração na consistência das fezes e infiltração dos leucócitos na parede intestinal. Como a 5-HT pode também ser produzida no trato GI pelas células enterocromafins e pelas células inflamatórias

especula-se que o seu aumento leva a um maior consumo periférico de substratos tornando-os menos disponíveis para a produção cerebral. Dessa forma, a alteração da microbiota intestinal, leva a inflamação e proliferação de células inflamatórias, que por sua vez produzem mais serotonina periférica, indisponibilizando a matéria prima para a sua produção cerebral que pode levar as disfunções cognitivas encontradas no TEA (De Theije *et al.*, 2011).

No presente estudo, alguns achados apontam nessa direção: foi encontrada uma frequência de história de intolerância alimentar nas mães (11,2%) e nos pais (8,4%) das crianças com TEA; houve registros de uma elevada prevalência de infecção gestacional e uso de antibióticos durante a gestação, o que poderia levar a alterações na microbiota durante o desenvolvimento fetal e uma significativa diferença em relação a presença de sintomas GI entre os pacientes com TEA grave.

O presente estudo apresentou algumas limitações que devem ser colocadas para reflexão. A amostra foi obtida em um centro de atenção médica especializada de nível terciário que possui a vantagem de contar com laboratórios, centros de neuroimagem e equipe interdisciplinar especializada e capacitada para a investigação dos pacientes. Entretanto, não foi possível se certificar que todos os pacientes realizaram os exames em um mesmo laboratório, apesar de terem sido feitos esforços para que isso fosse atingido. Outro ponto importante foi o fato de que não foi possível se conseguir dados provenientes de crianças saudáveis, de todas as variáveis, a fim de serem utilizados como controles. O fato de o estudo contar com dados retrospectivos em sua natureza, permite que dados importantes sejam perdidos ou que não sejam acurados.

3.5 REFLEXOES E PERSPECTIVAS FUTURAS

Apesar das limitações, acredita-se que o presente estudo tenha conseguido atingir seu objetivo, como um subprojeto de uma tese maior, que é o de demonstrar a profunda complexidade e heterogeneidade do TEA. Esse é, talvez, o ponto chave para se iniciar a busca pela compreensão do autismo. Centenas de fatores de risco, que muitas vezes se interconectam de formas variáveis e inconsistentes, síndromes genéticas absolutamente distintas em sua apresentação clínica, mas que são todas diagnosticadas sob o mesmo rotulo de autismo e explicações fisiopatológicas complexas que conseguem fazer suposições acerca de apenas um grupo específico de pacientes. Tudo isso torna muito difícil compreender o autismo como uma entidade única, como um diagnóstico definido.

Como perspectiva futura, e como próximo passo desta tese, o objetivo será demonstrar que o autismo, pode não estar obrigatoriamente ligado a um comprometimento funcional.

4 SEGUNDO CAPÍTULO – AVALIAÇÃO DE SINTOMAS DE AUTISMO NA POPULAÇÃO GERAL

4.1 INTRODUÇÃO

Uma vez que se pretende avançar na compreensão e definição do TEA não como um diagnóstico específico, mas como um sintoma, deve-se poder observar a sua presença não apenas no ambiente clínico associado a um comprometimento funcional importante, mas também na população geral e plenamente funcional.

Como vimos na seção anterior, tradicionalmente, o TEA sempre foi considerado uma condição clínica distinta da população geral, como um diagnóstico a ser realizado. Entretanto, dada as evidências de sua complexidade e do amplo grau de variação na gravidade de sua apresentação pode ser esperado que traços autistas possam ser encontrados distribuídos na população (Constantino e Todd, 2003).

A apresentação subclínica de um ou mais comportamentos ou traços qualitativamente similares aos aspectos encontrados no autismo foi denominado Fenótipo Ampliado do Autismo (FAA) e foi inicialmente descrito em familiares de crianças com TEA (Baron-Cohen e Hammer, 1997). Leo Kanner, considerado o pai do autismo, em suas descrições iniciais de 11 casos já havia relatado que muitos dos pais de seus pacientes eram “muito inteligentes” com atributos educacionais e profissionais extraordinários. Ao mesmo tempo, ele via sinais sutis, nestes pais, similares aos encontrados em seus pacientes, incluindo a obsessão a detalhes, uma inadequação social e comportamentos mais rígidos (Kanner, 1943).

Posteriormente, evidenciou-se que o FAA poderia se estender a população geral inclusive entre indivíduos sem história familiar ou qualquer relação com o autismo. Deste modo, o significado da palavra espectro, no TEA, ganhou novos contornos chamando a atenção de que os traços autistas não são apenas heterogêneos em sua natureza, mas também muito variáveis em seus níveis de gravidade podendo ser encontrado até mesmo em nível subclínico (Baron-Cohen, 2008).

É importante notar que as pessoas com o FAA não são funcionalmente comprometidas. Entretanto, assim como outros sintomas, estes traços podem levar a um impacto no funcionamento diário. Indivíduos com o FAA podem apresentar habilidades intactas em alguns ambientes, demonstrando uma interação social rotineira adequada ou ainda mantendo diálogos com pessoas familiares e que compartilham de seus interesses. As fraquezas

e dificuldades, no entanto, podem se tornar mais aparentes fora das situações habituais, levando a dificuldades de relacionamento, na formação de sistemas de suporte social e por vezes sensação de solidão. Indivíduos dentro do FAA podem ainda demonstrar comprometimentos nas realizações profissionais, regulação emocional e na capacidade de lidar com diferentes situações (Stevenson e Hart, 2017).

Não se pretende aqui minimizar o impacto do TEA na vida de milhões de famílias ao redor do mundo, entretanto, a compreensão e a definição do autismo, passa pela necessidade de se aventar a possibilidade de que ela se aproxime muito mais de um sintoma que um diagnóstico em si.

Um exemplo de situação semelhante seria a cefaleia, também conhecida como “dor de cabeça”, uma experiência quase universal. De acordo com a Sociedade Internacional de Cefaleias (*International Headache Society*) existem mais de 150 tipos diferentes de cefaleias. Algumas delas são consideradas incapacitantes, outras, contínuas e de fraca intensidade, e outras associadas a situações muito específicas. Sua fisiopatologia ainda não foi completamente compreendida. Centenas de fatores causais já foram catalogadas podendo a cefaleia ser primária ou secundária, genética ou adquirida. Além disso, incontáveis fatores podem influenciar na gravidade de sua apresentação e encontra-se associada a diversas comorbidades (Rizzoli e Mullally, 2018).

Ainda assim, a humanidade convive, as vezes de forma melhor, outras vezes pior, com este que é considerado um dos sintomas clínicos mais comuns. Possivelmente, seja assim com o autismo. Para isso, o objetivo deste estudo foi verificar a presença de sintomas de TEA em uma população representativa de estudantes universitários do Estado de Santa Catarina.

4.2 METODOLOGIA

4.2.1 População, instrumentos e procedimentos

Foram avaliados estudantes de graduação regularmente matriculados em universidade e centros de ensino superior, públicos e privados, localizados no Estado de Santa Catarina.

O estudo baseou-se na aplicação de um questionário eletrônico acessado através de um endereço eletrônico ou compartilhado através das redes sociais ou aplicativos de mensagens

particulares de cada estudante e continha perguntas acerca de dados sociodemográficos (idade, sexo, curso de graduação), clínicos (história pregressa de diagnóstico de transtorno neuropsiquiátrico) e o questionário *Autism Spectrum Quocient* (AQ) (Anexo E) em sua versão validada e traduzida para o português.

O questionário eletrônico foi desenvolvido de modo que a sua primeira página continha o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Anexo A) que continha toda a fundamentação teórica do estudo, seus riscos e benefícios, a metodologia utilizada pelos pesquisadores para garantir a privacidade e o sigilo dos dados e os procedimentos para a coleta de dados. Uma vez lido, o direcionamento a página contendo as perguntas só era permitido após o aluno fornecer seu consentimento pressionando “sim” em uma caixa de resposta. Caso a resposta fosse negativa a página se fechava automaticamente, não permitindo o acesso as perguntas. Uma vez concordando, o questionário poderia ser respondido uma única vez.

Os estudantes foram recrutados através de um *website* de internet criado pelos pesquisadores contando com endereço e domínios únicos onde o questionário aplicado foi hospedado em um servidor seguro através do qual as repostas dos estudantes era criptografado antes de ser enviado aos pesquisadores.

Os participantes também foram recrutados através das mídias sociais pertencentes as associações atléticas e acadêmicas das diversas disciplinas de cada um dos cursos de graduação de Santa Catarina que por sua vez possuíam o contato dos alunos quer através de correio eletrônico, quer através das mídias sociais, pessoas ou por meio de aplicativos de mensagens eletrônicas (*WhatsApp*).

O instrumento de coleta de dados consistia, principalmente, na aplicação de uma escala de avaliação de sintomas de autismo. O AQ é um questionário contendo 50 perguntas auto-aplicáveis desenhado para avaliar os sintomas centrais e os traços de personalidade associados ao TEA, na população adulta, tanto em ambiente clínico quando na população geral. Cada item deste questionário contém uma frase que os sujeitos respondem em uma escala Linkert de quatro pontos (“concordo totalmente”, “concordo parcialmente”, “discordo parcialmente” e “discordo totalmente”). Posteriormente, cada item do AQ era computado de maneira binária, de modo que as respostas poderiam ser traduzidas em números, sendo o número “um” direcionando ao TEA e “zero” direcionando a ausência do sintoma. Os itens eram então somados levando a um total possível de 50 pontos. Escores mais altos indicavam uma maior possibilidade de TEA, determinando-se um ponto de corte de 32 pontos na identificação de indivíduos com níveis significativos de traços de autismo (Baron-Cohen *et al.*, 2001).

O AQ também foi posteriormente dividido em cinco subescalas (habilidades sociais, mudança de atenção, atenção a detalhes, comunicação e imaginação) seguindo-se a pontuação binária descrita anteriormente, sendo o número “um” sugerindo autismo e “zero” a ausência de traços autistas. Em 24 assertivas a pontuação “um” era dada as respostas “concordo totalmente” e “concordo parcialmente” (assertivas 2, 4, 5, 6, 7, 9, 12, 13, 16, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 26, 33, 35, 39, 41, 42, 43, 45, 46) e em 26 assertivas para “discordo parcialmente” ou “discordo totalmente” (assertivas 1, 3, 8, 10, 11, 14, 15, 17, 24, 25, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 34, 36, 37, 38, 40, 44, 47, 48, 49, 50). Os resultados em cada uma das cinco subescalas variaram de 0 a 10 e, novamente, quanto maior o valor encontrado, mais significativos eram os traços de TEA (112). Para este estudo, foi utilizada a versão traduzida e validada para a língua portuguesa do AQ (Sato *et al.*, 2009).

Uma vez obtidas as respostas, os estudantes de graduação foram divididos em oito áreas de ensino superior: ciências agrárias, ciências biológicas, engenharia, ciências da saúde, ciências humanas, linguística letras e artes, ciências sociais, tecnologia e ciências exatas e da terra, de acordo com o Ministério da Educação e Cultura do Brasil (Ministério Da Educação, 2020).

A privacidade e a confidencialidade dos sujeitos e dos dados foram garantidas, uma vez que nenhum dado de identificação nominal foi incluído no estudo. O projeto foi submetido e aprovado pelo comitê de ética e pesquisa em seres humanos da Universidade do Sul de Santa Catarina (nº 3.265.914/CAAE: 04701218.4.0000.5369) (Anexo E).

4.2.2 Análise estatística

A análise inferencial dos dados foi realizada utilizando-se o software IBM *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) versão 21.0 (Ibm Corporation, 2012).

Nesta pesquisa foi utilizada a análise descritiva de frequências. Os resultados da caracterização da amostra foram representados por n (número absoluto) e % (porcentagem). Os achados da caracterização Quociente de Espectro do Austismo os achados foram representados por média±desvio padrão (DP).

Inicialmente para as variáveis quantitativas foi realizado o teste de normalidade de *Komogorov-Smirnov* e após pela distribuição não normal optou-se pelo valor de p do Teste H de Kruskal-Wallis seguido do *post-hoc* de Dunn. Foi considerado como diferença estatisticamente significativa um valor de $p \leq 0,05$.

As tabelas foram construídas no Microsoft Excel e as figuras no Graph Prism versão 5.0 (Graph Prism Versão 5.0., 2012).

4.3 RESULTADOS

Um total de 1167 estudantes de graduação responderam ao questionário e compuseram a amostra total, sendo 831 (71,2%) dos estudantes do gênero feminino e 334 do gênero masculino (tabela 6). Em relação a idade, os alunos foram divididos em intervalos, sendo o intervalo de idade com maior prevalência de 18 a 21 anos totalizando 577 (49,4%) dos estudantes. História pregressa de diagnóstico de transtorno neuropsiquiátrico foi reportado por 310 (26,5%) dos estudantes.

Do total de estudantes analisados, de acordo com o questionário aplicado, 44 (3,8%) apresentavam sintomas clínicos compatíveis com TEA. A área do conhecimento de maior prevalência de recebimento de respostas foi representada pelas ciências da saúde correspondendo a 629 (53,9%) dos questionários respondidos.

Tabela 6. Caracterização da amostra de alunos participantes do estudo. São analisados variáveis como sexo, idade, diagnóstico prévio, escore e área do conhecimento em curso.

Variáveis	n (%)
Sexo	
Feminino	831 (71,2)
Masculino	334 (28,6)
Não respondeu	2 (0,2)
Idade	
18 a 21 anos	577 (49,4)
22 a 24 anos	309 (26,5)
25 a 27 anos	124 (10,6)
28 a 30 anos	54 (4,6)
30 anos ou mais	103 (8,8)
Diagnóstico Prévio	
Não	857 (73,1)
Sim	310 (26,5)
Escore	
Sem Sinais Sugestivos	1123 (96,2)
Sinais Clínicos Compatíveis com TEA	44 (3,8)
Área do Conhecimento	
Ciências da saúde	629 (53,9)
Engenharias	143 (12,3)
Ciências sociais aplicadas	103 (8,8)
Ciências humanas	97 (8,3)
Ciências exatas e da terra	88 (7,5)
Ciências biológicas	46 (3,9)
Ciências agrárias	28 (2,4)
Outras	25 (2,1)
Linguística, letras e artes	8 (0,7)

TEA (Transtorno do Espectro Autista)

Quando se avaliou a presença de sintomas compatíveis com TEA de acordo com cada área de conhecimento, verificou-se que a área de conhecimento que teve maior porcentagem de indivíduos com traços autistas foi a de Linguística, letras e artes com 12,5%, seguido pelas Engenharias com 6,9% (Tabela 7).

Tabela 7. Associação entre as áreas de conhecimento e sintomas sugestivos ou não de TEA nos alunos participantes do estudo. A tabela demonstra a relação entre a área de conhecimento com o score AQ.

Área do conhecimento	score AQ > 32 n (%)	score AQ > 32 n(%)
Ciências da saúde	604 (96,1)	25 (3,9)
Engenharias	133 (93,1)	10 (6,9)
Ciências humanas	94 (97)	3 (3)
Ciências sociais aplicadas	100 (97,1)	3 (2,9)
Linguística, letras e artes	7 (87,5)	1 (12,5)
Ciências agrárias	28 (100)	0 (0)
Ciências exatas e da terra	86 (97,7)	2 (2,3)
Ciências biológicas	46 (100)	0 (0)
Outras	25 (100)	0 (0)

AQ *Autism Spectrum Quocient*

Em relação aos domínios do Quociente de Espectro do Autismo, no domínio habilidades sociais (figura 5) a média dos estudantes das ciências sociais foi de $2,28 \pm 2,02$, apresentando uma tendência ao menor escore estatisticamente significativo em comparação com os estudantes de graduação das ciências sociais que obtiveram $3,24 \pm 2,20$, seguindo aos estudantes de ciências exatas e da terra com média de $3,40 \pm 2,17$ e com os estudantes de ciências biológicas com média de $3,72 \pm 2,34$.

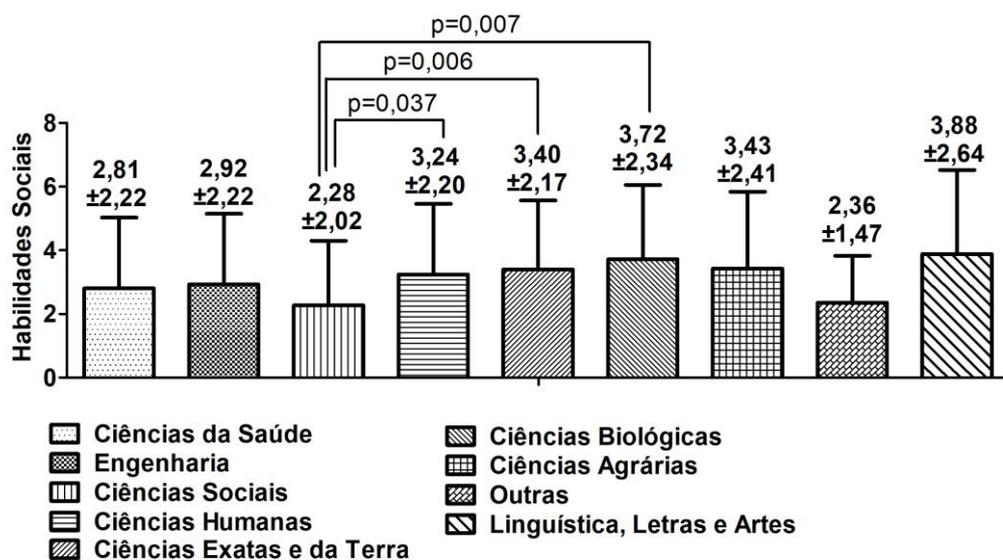


Figura 5. Comparação entre as áreas de conhecimento em relação às habilidades sociais. Valores expressos em Média + Desvio Padrão, significância quando $p < 0,05$. Teste estatístico aplicado: teste de normalidade de Komogorov-Smirnov e após pela distribuição não normal optou-se pelo valor de p do Teste H de Kruskal-Wallis seguido do post-hoc de DUM.

Na subescala mudança de atenção (figura 6), os maiores escores foram encontrados entre os alunos de linguística, letras e artes ($7,38 \pm 1,51$) e os menores, ciências humanas ($5,43 \pm 1,96$).

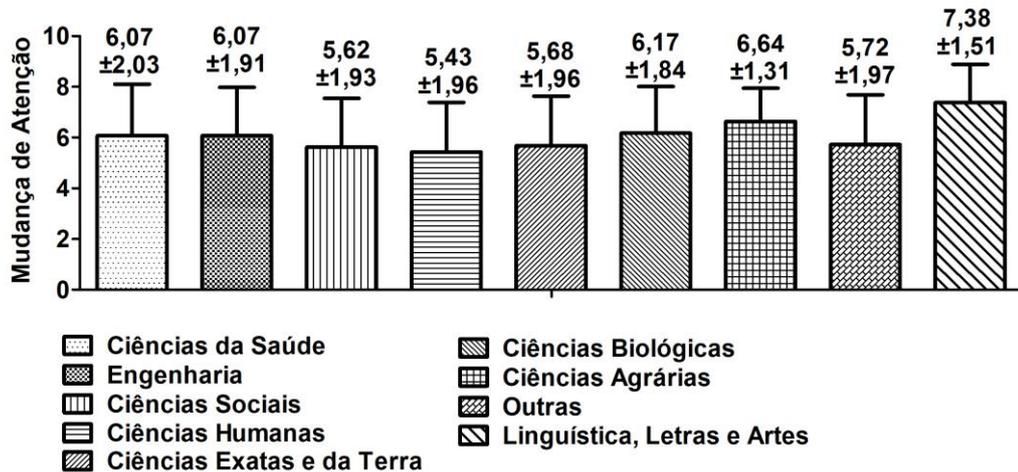


Figura 6. Comparação entre as áreas conhecimento em relação a mudança de atenção. Valores expressos em Média \pm Desvio Padrão, significância quando $p < 0,05$. Teste estatístico aplicado: teste de normalidade de Komogorov-Smirnov e após pela distribuição não normal optou-se pelo valor de p do Teste H de Kruskal-Wallis seguido do *post-hoc* de DUM

No domínio atenção aos detalhes (figura 7), a média dos estudantes de ciências da saúde foi de $4,96 \pm 2,28$ tendo uma menor média estatisticamente significativa em comparação com os estudantes de engenharia que obtiveram com média $5,93 \pm 2,11$. Quando comparados os estudantes de engenharia com os estudantes de ciências humanas, que tiveram como média $4,99 \pm 2,27$, os estudantes de engenharia também obtiveram uma média maior para a atenção aos detalhes.

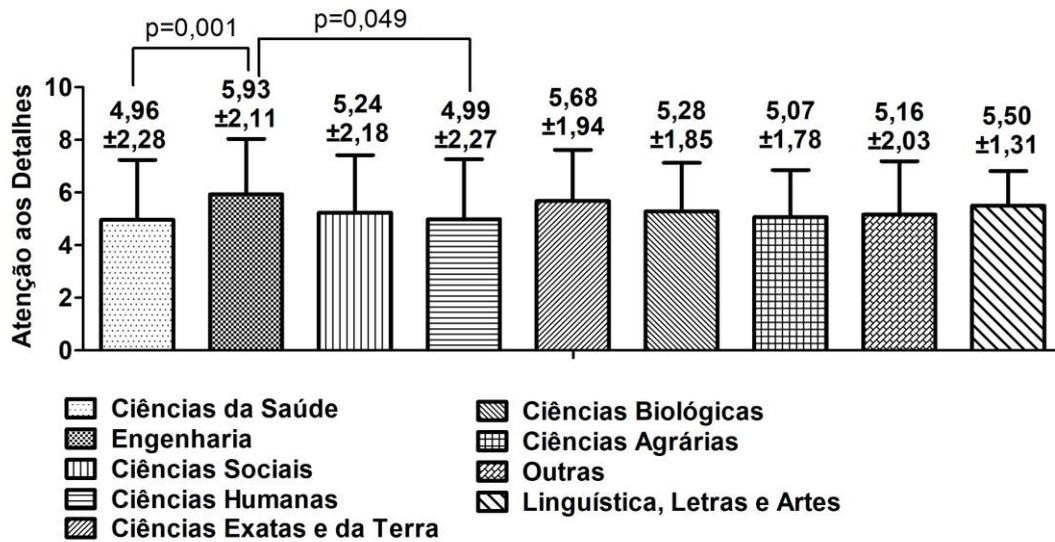


Figura 7. Comparação entre as áreas de conhecimento em relação a atenção aos detalhes. Valores expressos em Média + Desvio Padrão, significância quando $p < 0,05$. Teste estatístico aplicado: teste de normalidade de Komogorov-Smirnov e após pela distribuição não normal optou-se pelo valor de p do Teste H de Kruskal-Wallis seguido do post-hoc de DUM.

Em relação as habilidades de comunicação (figura 8) a média dos estudantes de ciências da saúde foi de $3,16 \pm 1,89$ tendo uma menor média estaticamente significativa em comparação com os estudantes de ciências agrárias que obteve $4,39 \pm 1,95$ e quando comparado as ciências sociais com este grupo a média foi de $3,02 \pm 1,71$ sendo estaticamente significativa menor.

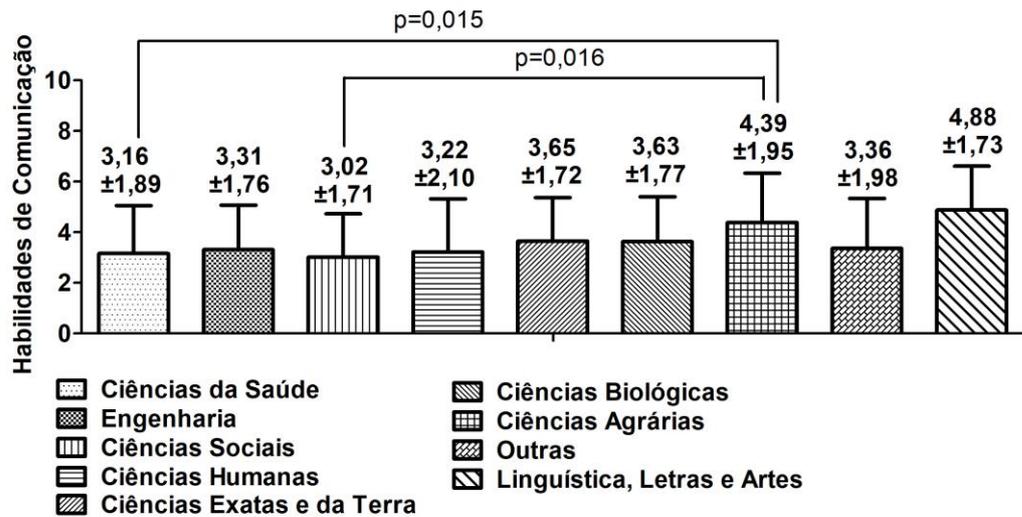


Figura 8. Comparação entre as áreas de conhecimento em relação as habilidades de comunicação. Valores expressos em Média ± Desvio Padrão, significância quando $p < 0,05$. Teste estatístico aplicado: teste de normalidade de *Komogorov-Smirnov* e após pela distribuição não normal optou-se pelo valor de p do Teste H de Kruskal-Wallis seguido do *post-hoc* de DUM

Finalmente, em relação a subescala que avalia a capacidade de imaginação (figura 9) a média dos estudantes de ciências da saúde foi de $2,89 \pm 1,75$ tendo uma média menor estatisticamente significativa em comparação com os estudantes de engenharia que obtiveram uma média de $3,45 \pm 1,87$. E este grupo também teve uma média maior e estatisticamente significativa em comparação às ciências humanas, que obteve $2,58 \pm 1,55$.

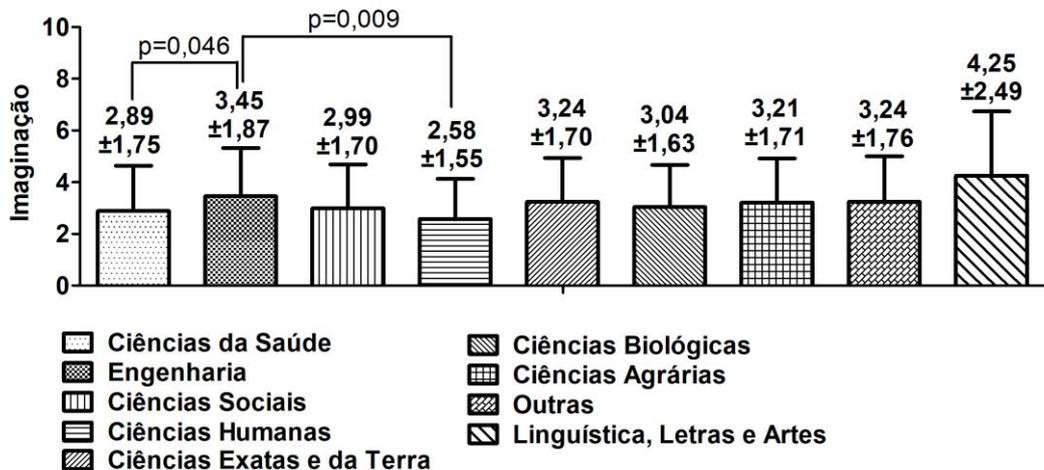


Figura 9. Comparação entre as áreas de conhecimento em relação a imaginação. Valores expressos em Média ± Desvio Padrão, significância quando $p < 0,05$. Teste estatístico aplicado: teste de normalidade de *Komogorov-Smirnov* e após pela distribuição não normal optou-se pelo valor de p do Teste H de Kruskal-Wallis seguido do *post-hoc* de DUM

4.4 DISCUSSÃO

A avaliação de estudantes de graduação em pesquisas científicas, sobretudo em estudos psicológicos e transculturais é uma prática extremamente comum devido a algumas vantagens apresentadas. Em geral, tal amostra populacional apresenta facilidades no recrutamento, menor custo de administração e chances menores de vieses de amostra ou de resposta (Arnett, 2008).

Ao contrário do que se poderia supor, uma amostra composta por estudantes universitários, abrangendo centros de ensino público e privados, pode ser considerada homogênea mesmo do ponto de vista econômico. Em estudo realizado em 2017, utilizando os dados da Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios (PNAD) demonstrou que tanto em escolas públicas ou privadas de ensino superior, a faixa de distribuição de renda dos alunos variava muito pouco (Malbouisson *et al.*, 2017).

O presente estudo foi realizado utilizando uma amostra contendo mais de mil estudantes universitários de escolas públicas ou privadas localizadas no Estado de Santa Catarina, sendo utilizado como instrumento de coleta de dados, um questionário eletrônico.

A utilização de questionários eletrônicos resulta em diversas vantagens. De acordo com Vickair *et al.* (2010) tal metodologia permite um alcance potencialmente global da amostra, uma vez que mais de 90% dos estudantes universitários tem acesso diário a *internet* e a redes de contato social. Além disso, pode ser administrado de uma forma rápida, a um menor custo e de modo mais eficiente devido a sua conveniência de preenchimento. Finalmente, é um método seguro garantindo a privacidade e anonimidade dos participantes.

Avaliando um total de 1167 estudantes, verificou-se um predomínio de indivíduos do sexo feminino, com cerca de 70% da amostra, com uma idade, em sua maioria, na faixa entre 18 e 21 anos.

Atualmente, no Brasil, as mulheres constituem a maioria entre os estudantes de nível superior, tal fato, deriva-se da maior escolarização feminina em geral (respondem por 52% das matrículas no ensino médio no país), apresentam menores taxas de repetência e evasão escolar e uma taxa maior de conclusão do ensino médio. Desta forma, o sexo feminino representa 53,8% das matrículas no ensino superior público e 58,6% no privado, 66% dos estudantes de pós graduação a nível de mestrado e 50,8% de doutorado (Barros e Mourão, 2018).

Em relação a presença de histórico progresso, cerca de 27% dos estudantes relataram ter tido diagnóstico prévio de algum transtorno neuropsiquiátrico, que não o autismo. Em 2008, Stallman e Shochet avaliaram a prevalência de transtornos e queixas relacionadas a saúde mental em uma amostra predominantemente feminina de 1168 estudantes universitários, evidenciando que cerca de 24,4% apresentavam questões psiquiátricas e comportamentais graves e 45% leves a moderados sendo, muitas vezes, subdiagnosticados (Stallman, 2008).

Em relação ao TEA, a aplicação de uma escala de avaliação de sintomas de autismo evidenciou que 3,8% da amostra apresentava sinais clínicos compatíveis com TEA, de acordo com a pontuação de corte proposta. Estudos avaliando sintomas de TEA em estudantes de graduação variam muito. Em 2011, White *et al.* (2011) avaliou um grupo de 667 estudantes de graduação (228 homens e 439 mulheres) aplicando o questionário AQ e verificando que 1,9% da amostra apresentava sinais clínicos de TEA (White *et al.*, 2011; Pesonen *et al.*, 2020).

Em outro estudo, com uma amostra maior de indivíduos, pesquisadores avaliaram 2819 estudantes (1328 homens e 1491 mulheres) de graduação de 9 diferentes instituições de ensino superior localizadas na Polônia chegando a uma prevalência de 1,56% da amostra com sinais compatíveis com TEA (Pisula *et al.*, 2013).

Outro estudo, realizado em 2005, avaliando 100 indivíduos com idades entre 18 e 25 anos (40 homens e 20 mulheres), verificou que 7,34% dos estudantes apresentavam sinais clínicos compatíveis com TEA de acordo com o questionário (AQ) aplicado (Woodbury-Smith *et al.*, 2005).

Mais interessante que os dados de frequência total de sintomas clínicos compatíveis com o TEA, é a avaliação e correlação das diferentes subescalas de sintomas de acordo com as áreas de conhecimento dos estudantes de graduação.

Uma exceção foi representada pelos estudantes de Linguística, literatura e artes. Embora tenham sido representados por apenas 8 estudantes, todos eles provenientes de cursos superiores de música, 1 deles apresentou sinais compatíveis com TEA (12,5%), sendo ainda que, em geral, os escores obtidos nas subescalas do ASQ (habilidades sociais, mudança de atenção, comunicação e imaginação) foram maiores que de todas as outras áreas do conhecimento.

Em 2019, Wenhart *et al.* avaliaram a presença de traços de autismo em músicos profissionais (64 profissionais de música erudita com média de 25 anos de idade) sendo que 31 deles apresentavam *Absolute Pitch* (Afinação Perfeita – AP) e 33 apresentavam *Relative Pitch* (Afinação Relativa – AR). Dos músicos com AP, 20,48% apresentavam sintomas compatíveis

com TEA enquanto 16,88% dos músicos com AR apresentaram resultados acima do ponto de corte. Além disso, as idades de início da prática do instrumento foram em média 5,97 anos (AP) e 7,12 anos (AR). Finalmente, o tempo diário dedicado ao estudo do instrumento foi de 11,96 horas/dia (AP) e 13,73 horas/dia (AR) em média (Wenhart *et al.*, 2019).

É possível que características centrais do autismo favoreçam o sucesso em uma área profissional tão difícil quanto a música erudita. A AP por exemplo, pode ser definida como a rara habilidade em identificar ou produzir um tom musical corretamente, sem o auxílio de instrumentos de apoio. Frequentemente considerado um reflexo de talento musical, pode, no entanto, estar associada a hiper-reatividade sensorial encontrada no autismo (Bonnell *et al.*, 2003).

Em estudo realizado por Dohn *et al.* (2012), comparando 16 músicos com AP, 18 sem AP e 16 indivíduos sem habilidades musicais, verificaram que os músicos com AP apresentaram escores mais altos no AQ e obtiveram ainda pontuações mais elevadas nas subescalas de habilidades sociais, mudança de atenção, atenção a detalhes, comunicação e imaginação, corroborando os achados do presente estudo.

É possível especular que a presença de traços de autismo, como habilidades sensoriais específicas para a música, tenha direcionado os estudantes de música erudita, desde cedo, a se interessar por um instrumento musical. Além disso, sintomas de TEA como resistência a mudanças na rotina, favoreceriam a afinidade por músicas e partituras com todas as suas regras rígidas. Finalmente, as dificuldades de interação social e o interesse restrito, inerentes ao autismo, permitiriam também as horas incessantes de estudo necessárias na prática de um músico erudito profissional.

O mesmo pode ser dizer também dos estudantes de Engenharia, em que 6,9% apresentaram sintomas compatíveis com TEA e de Ciências exatas. Ambas as áreas de conhecimento obtiveram pontuações significativamente maiores em relação as habilidades sociais, atenção a detalhes e imaginação.

Estes dados corroboram os achados de Baron-Cohen *et al.* (2001) que avaliaram 840 estudantes de graduação, comparando a presença de sintomas de TEA, de acordo com o questionário AQ, entre estudantes de ciências (engenharias, ciências da computação, matemática e física) e os demais estudantes. Foi observado que pessoas profissionalmente envolvidas com ciências apresentaram pontuações mais elevadas, tanto na pontuação total quanto nas subescalas, evidenciando que pode existir uma ligação entre a presença de traços de autismo e a escolha profissional.

Novamente, é possível que características como resistência a mudança de regras e rotinas, uma alta atenção a detalhes, menor intensidade de variação nos níveis de atenção e maior afinidade para o pensamento concreto, favoreçam as carreiras que dependem de alta afinidade por números e cálculos.

A competência matemática é uma habilidade que o indivíduo tem de desenvolver e aplicar o pensamento matemático (pensamento lógico e espacial) e suas representações (modelos, gráficos e tabelas), a fim de resolver uma série de problemas. Tal habilidade demanda um profundo conhecimento de regras, algoritmos e métodos de processamento numérico. Para tanto, aspectos cognitivos favoráveis a matemática seriam a memória declarativa, memória de trabalho e velocidade de processamento espacial que poderiam ser encontradas em maior nível entre os indivíduos com TEA (Peklari, 2019).

De fato, umas das teorias que tentam explicar o autismo é a teoria da alta-sistematização e baixa-empatia. De acordo com esta teoria, o cérebro humano possui um mecanismo de sistematização. A sistematização é o modo através do qual o cérebro consegue prever alterações, e as alterações podem ser altamente regulares, obedecendo regras e padrões (por exemplo o nascer e o pôr do sol, as estações do ano, as sequências das notas musicais e as regras numéricas e matemáticas). Dessa forma, o cérebro autista seria um cérebro altamente sistematizado tornando-o menos apto a lidar com os aspectos irregulares da vida diária como a interação social (Baron-Cohen, 2006).

Dessa forma, o autismo como um sintoma, pode ser encontrado na população geral, sem estar diretamente relacionado a algum prejuízo funcional, por vezes, favorecendo a escolha ou mesmo conferindo as habilidades necessárias para a execução de um trabalho, devendo ser adequadamente direcionado e estimulado.

O presente subprojeto apresentou limitações. Apesar das vantagens descritas inicialmente no texto, a utilização de amostras de estudantes de graduação não pode ser considerada totalmente representativa da população geral. É possível que ela represente um extrato específico da sociedade com pouca variação no nível socioeconômico e educacional. Além disso, não foi uma amostra equilibrada, tendo um excesso de participantes do sexo feminino (o TEA é uma condição predominantemente masculina, seria possível encontrar números diferentes caso a amostra tivesse maior representatividade masculina). Finalmente, as áreas de conhecimento também não foram representadas de forma equânime. Os cursos das áreas de saúde tiveram uma taxa de resposta muito maior (talvez pelo interesse relacionado ao tema) enquanto que outras áreas tiveram uma taxa de resposta muito menor (talvez pelo número

de alunos em cada curso, que varia ou talvez pelo menor interesse em responder a questionários extensos).

4.5 REFLEXOES E PERSPECTIVAS FUTURAS

Apesar das limitações, o subprojeto apresentado parece ter cumprido o seu papel, que era o de demonstrar a possibilidade de se encontrar sintomas de autismo na população geral, em indivíduos funcionais e sem definição diagnóstica.

Sendo o autismo um sintoma e não um diagnóstico, qual seria o papel de um laboratório pré-clínico de pesquisa do autismo? Seria possível se estruturar e caracterizar um modelo animal de autismo que permitisse a indução deste sintoma?

Essa possibilidade será abordada no subprojeto a seguir onde o estudo procurará demonstrar um modelo animal de autismo, suas vantagens, desvantagens, e aplicações futuras.

5 TERCEIRO CAPÍTULO – O ENVOLVIMENTO DO METABOLISMO DO COLESTEROL NA FISIOPATOLOGIA DO AUTISMO

5.1 INTRODUÇÃO

Ao longo da história, um grande número de pesquisas buscou, até o momento sem sucesso, identificar uma teoria cognitiva ou ainda uma causa neurobiológica comum para o autismo (Ure *et al.*, 2018). Uma vez que se verifica uma inabilidade em uma única teoria cognitiva explicar todas as diferentes apresentações clínicas do TEA e dada a identificação de um número crescente de genes relacionados ao autismo, muito mais que uma entidade diagnóstica única, existem vários caminhos que sugerem o autismo como múltiplas condições (atualmente chamadas de transtornos do espectro do autismo) que compartilham sinais e sintomas (Wozniak *et al.*, 2017). Assim, o TEA seria muito mais um sintoma ou um conjunto de sinais e sintomas que um único diagnóstico.

Happé *et al.* (2006) já havia chamado a atenção da comunidade científica de que a heterogeneidade clínica do autismo se tornaria um desafio intransponível na compreensão e no desenvolvimento de tratamento. De fato, apesar dos melhores esforços, ainda não existe um consenso quanto ao melhor tratamento a ser administrado a pessoas com autismo. Stahmer *et al.* (2011) apontam que, para cada tratamento proposto, é comum que 50% dos pacientes apresentem uma melhora significativa, enquanto que a outra metade demonstre apenas ganhos modestos ou limitados.

A pesquisa do autismo, então, passa a ser um exercício muito mais individual, onde características clínicas e laboratoriais se unem formando pequenos grupos com características similares auxiliando no direcionamento de esforços diagnósticos e terapêuticos para um dos vários tipos de autismos.

A exemplo disso, uma das formas atuais de se estudar o TEA é através da busca de diferentes subtipos genéticos de autismo a fim de se obter uma amostra clínica mais homogênea. Essa metodologia deu origem ao conceito de “autismo sindrômico”, quando o TEA encontra-se associado a um ou mais sinais e sintomas morfológicos que auxiliam na identificação de doenças genéticas específicas, ao contrário do “autismo não-sindrômico” que caracteriza um TEA idiopático não associado a nenhum sinal ou sintomas específicos (Cohen *et al.*, 2005).

Um bom exemplo é a síndrome de Smith-Lemli-Opitz (SLO), inicialmente descrita em 1964 por três pediatras, David Smith, Luc Lemli e John Opitz que relataram três casos que

apresentavam em comum características faciais distintas, microcefalia, cristas alveolares alargadas, hipospadia e atraso global do desenvolvimento (Smith *et al.*, 1964).

Interessantemente, uma significativa parcela dos pacientes com SLO apresentam sinais e sintomas típicos do TEA, não apenas os sintomas centrais mas também várias de suas características secundárias e comorbidades como dificuldades de sono, seletividade alimentar e alterações sensoriais (Freeman *et al.*, 2013). Em uma coorte de pacientes com SLO publicada por Sikora *et al.* (2006) verificou-se que 86% dos pacientes preenchiam critérios diagnósticos para TEA, concluindo-se que os sinais de autismo podem ser considerados universais em pacientes com SLO.

Fisiopatologicamente, observou-se que os pacientes com SLO apresentavam níveis extremamente baixos de colesterol sérico bem como níveis praticamente indetectáveis de ácidos biliares urinários. Posteriormente, uma análise dos níveis plasmáticos de esteróis levou a descoberta de níveis centenas de vezes maiores de 7-deidrocolesterol (7DHC), sugerindo uma deficiência de 7-deidrocolesterol redutase (DHCR7), enzima localizada no final da cadeia de biossíntese do colesterol (Irons *et al.*, 1993).

De todas as síndromes genéticas, a SLO é a que apresenta uma relação mais próxima com o autismo e a sua estreita relação fisiopatológica com o metabolismo do colesterol poderia sugerir que um envolvimento do colesterol no autismo em geral.

Inicialmente descrita no final da década de 1960 por Andreas Rett, a Síndrome de Rett (RS) é considerada a forma mais devastadoras de TEA. Com uma frequência de aproximadamente 1 caso para cada 10 mil nascidos vivos, a RS afeta quase que exclusivamente meninas. Clinicamente, caracteriza-se por período inicial de desenvolvimento neurológico normal até os 18 meses de idade, seguido por uma rápida deterioração clínica, perda da fala expressiva e de habilidades motoras que são substituídas por movimentos manuais estereotipados, crises epilépticas, distúrbios respiratórios e sintomas autísticos (Neul *et al.*, 2014). A RS foi também o primeiro transtorno dentro do espectro do autismo a ser geneticamente identificado, quando a descoberta sua relação com mutações no gene *Methyl Cp6 binding protein 2* (MECP2) (Amir *et al.*, 1999).

No ano de 2013, avaliou-se o perfil lipídico de pacientes com RS demonstraram alterações nos níveis séricos de lipoproteínas de alta densidade (HDL) e lipoproteínas de baixa densidade (LDL). Além disso, em modelos animais da RS, foi demonstrado que a utilização de estatinas (inibidores farmacológicos da biossíntese de colesterol) poderia corrigir estes

desequilíbrios, aliviando sintomas e sugerindo que o metabolismo do colesterol pode estar alterado em pacientes afetados pela RS (Segatto *et al.*, 2014).

Finalmente, há de se citar a síndrome do X-frágil (FXS) considerada a causa hereditária mais comum de e a causa genética mais comumente identificada de TEA (Crawford *et al.*, 2001). De acordo com Berry-Kravis *et al.* (2015), anormalidades no perfil lipídico foram relatados em pacientes com FXS com 26% a 35% dos indivíduos acometidos apresentando colesterol total abaixo do percentil 10 e mais de 20% preenchendo critérios laboratoriais para hipocolesterolemia (Berry-Kravis *et al.*, 2015).

5.1.1 Colesterol, cérebro e neurodesenvolvimento

O colesterol é uma das moléculas mais polivalentes na biologia humana sendo um componente fundamental dos hormônios esteróides, incluindo a pregnenolona, estrogênio, progesterona, testosterona, vitamina D e ácidos biliares (envolvidas na digestão, absorção e excreção de lipídeos) (Orth, 2012). Considerando-se especificamente o SNC, o cérebro contém 23% de todo o colesterol corporal embora represente apenas 2% do peso corporal total, indicando a importância desta molécula para o seu funcionamento (Dietschy, 2009).

Este lipídeo exerce um papel crucial no desenvolvimento e no funcionamento neuronal, sendo um constituinte da bainha de mielina e das membranas celulares. Especificamente, o colesterol é um dos componentes centrais que formam as vesículas sinápticas: sua formação, morfologia e liberação são criticamente dependentes deste lipídeo (Pfrieger, 2003).

No autismo, em estudo realizado por Benachenhou *et al.* (2019), comparando-se 79 indivíduos com autismo e 79 indivíduos saudáveis, verificou-se que a prevalência de hipocolesterolemia era três vezes maior no primeiro grupo. Sugeriu-se então que alterações na biossíntese do colesterol impactam o funcionamento de receptores cerebrais, na sinaptogênese, mielinização, síntese de hormônios esteróides e, subsequentemente, no desenvolvimento final do SNC resultando em várias das características encontradas no TEA (Aneja e Tierney, 2008).

5.2 OBJETIVOS

5.2.1 Objetivos gerais

- Caracterizar o envolvimento do metabolismo do colesterol em ratos submetidos ao modelo de indução do TEA pelo valproato de sódio.

5.2.2 Objetivos específicos

- Avaliar parâmetros de locomoção através do teste do campo aberto e comportamento do tipo autista nos dias 29 e 30 pós-natal, através de testes de interação social e teste do das bolas de gude em ratos machos submetidos ao modelo animal de TEA e expostos a atorvastatina ou sinvastatina;
- Realizar a dosagem de colesterol total no sangue periférico dos ratos expostos ao modelo animal de TEA e posteriormente tratados com atorvastatina ou sinvastatina;
- Avaliar parâmetros de estresse oxidativo – dosagem da atividade da superóxido dismutase (SOD), medida dos níveis de oxidação de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH), sulfidril e medida dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (*thiobarbituric acid reactive substances* – TBA-RS) no córtex e cerebelo de ratos machos submetidos ao modelo animal de TEA e expostos a atorvastatina ou sinvastatina.

5.3 MATERIAIS E MÉTODOS

5.3.1 Aspectos éticos

Todos os procedimentos experimentais envolvendo animais foram realizados de acordo com as recomendações internacionais para o cuidado e o uso de animais de laboratório, além das recomendações da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento para cuidados com animais. Este estudo foi submetido à avaliação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC) e aprovado sob protocolo número 049/2020-1 (ANEXO F).

5.3.2 Protocolo de exposição ao valproato de sódio (VPA)

Ratas *Wistar* foram acasaladas ao serem colocadas em caixas contendo os machos em uma proporção de 2 fêmeas para cada 1 macho ao final de um período de vigília. Após o início de um novo ciclo de vigília, uma lavagem vaginal foi feita para avaliar a prenhez. A presença ou não do conteúdo seminal foi determinada através de microscopia óptica. Fêmeas que tiveram conteúdo seminal positivo foram marcadas como dia “zero” da gestação no momento da visualização desse conteúdo. Essas fêmeas, agora denominadas matrizes, foram divididas em dois grupos (16 matrizes em cada) e foram alocadas em caixas individuais durante todo o período gestacional. No décimo-segundo dia de gestação, as matrizes receberam: I) administração intraperitoneal (i.p.) em dose única de 500mg/kg de VPA (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) dissolvida em solução salina a 0,9%, pH 7,4, (16 matrizes ao total) e II) injeção de solução salina 0,9% via i.p. (16 matrizes ao total). A partir disso, para cada grupo de 16 matrizes a previsão foi de 80 nascimentos ($5 \times 16 = 80$), sendo 40 fêmeas e 40 machos, em média. Totalizando 160 filhotes (80 fêmeas e 80 machos) em 32 matrizes. Optou-se por utilizar apenas animais machos uma vez que estudos apontam que apenas os animais machos expostos ao VPA no período pré-natal parecem desenvolver os sintomas associados ao TEA, mimetizando ainda a prevalência clínica do autismo, maior no sexo masculino (Mabunga *et al.*, 2015).

5.3.3 Protocolo de exposição as estatinas (Atorvastatina e Sinvastatina)

Após o nascimento, as proles de um dia de vida, provenientes dos grupos de matrizes expostas ao VPA e dos grupos de matrizes expostas à solução salina foram subdivididos em 4 grupos: I) Animais que receberam 10mg/kg (via oral) de Atorvastatina (Lípitior®; Pfizer; Nova Iorque, Estados Unidos), uma vez ao dia durante sete dias (começando no dia 22 pós-natal até o dia 29); II) Animais que receberam solução salina 0,9% via oral (40 proles, sendo 20 machos e 20 fêmeas); III) Animais que receberam 10mg/kg (via oral) de sinvastatina (Zocor®; Merck KGaA, Darmstadt, Germany), uma vez ao dia durante sete dias (começando no 22º dia PN até o dia 29º dia PN) (40 proles, sendo 20 machos e 20 fêmeas) e IV) Animais que receberam solução salina 0,9% via oral (40 proles, sendo 20 machos e 20 fêmeas) (Figura 10).

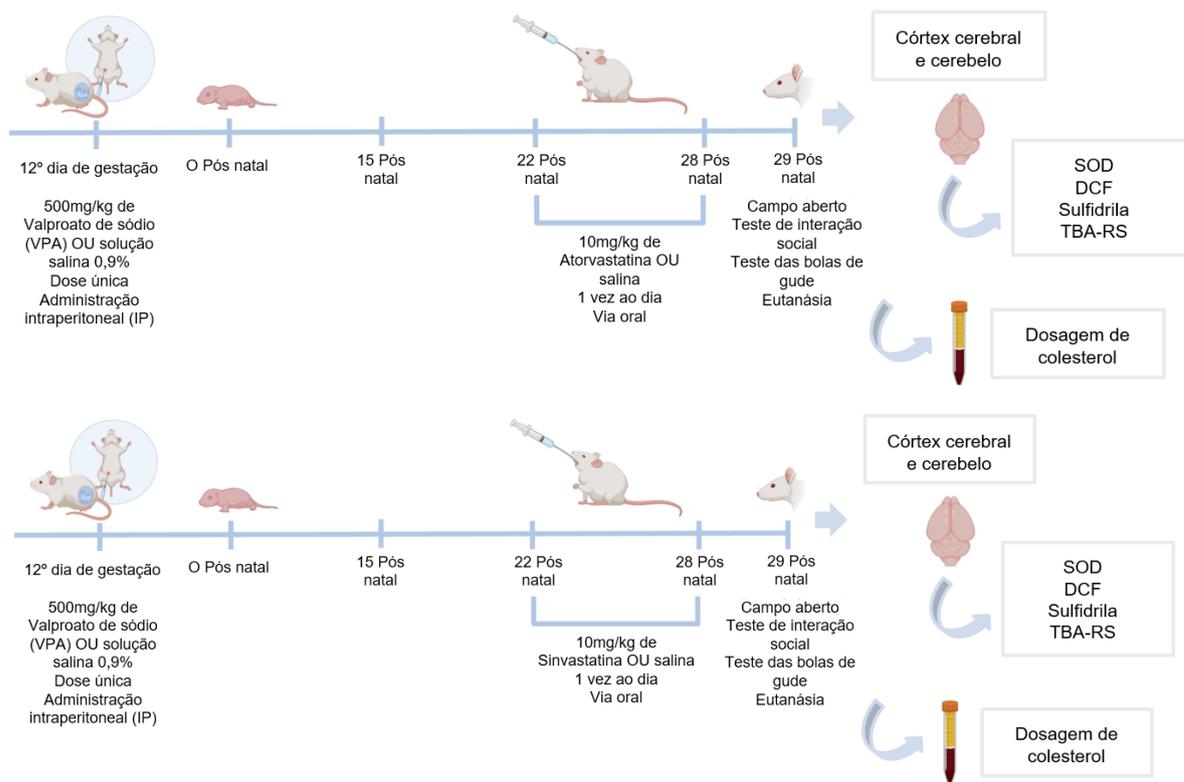


Figura 10: Representação esquemática dos desenhos experimentais realizados com animais submetidos aos tratamentos com VPA, ATV e SVT. Matrizes tratadas com VPA ou Salina no 12º dia de gestação; constituição da prole como modelo animal de TEA. A partir do 22º dia pós natal os animais foram tratados com ATV ou SVT e posteriormente submetidos a testes comportamentais e bioquímicos. (Fonte do autor).

5.3.4 Desenho experimental

O número (n) amostral de 10 animais por grupo faz-se necessário devido à alta variabilidade nos dados vindos de testes comportamentais. Dos 10 animais utilizados nos testes comportamentais, 7 deles foram eutanasiados e as estruturas cerebrais (córtex cerebral e cerebelo) e sangue coletados. Os outros 3 foram eutanasiados após a realização dos testes comportamentais e devidamente descartados.

Após o nascimento, as proles de um dia de vida, vindos dos grupos de matrizes expostas ao VPA e vindos dos grupos de matrizes expostas à solução salina foram subdivididos em 4 grupos: I) Animais que receberam 10mg/kg (via oral) de Atorvastatina (Lípitor®; Pfizer; Nova Iorque, Estados Unidos), uma vez ao dia durante sete dias (começando no dia 22 pós-natal até o dia 29) (40 proles, sendo todos machos); II) Animais que receberam solução salina 0,9% via oral (40 proles, sendo todos machos); III) Animais que receberam 10mg/kg (via oral) de sinvastatina (Zocor®; Merck KGaA, Darmstadt, Germany) uma vez ao dia durante sete dias (começando no 22º dia PN até o dia 29º dia PN) (40 proles, sendo todos machos) e IV) Animais que receberam solução salina 0,9% via oral (40 proles, sendo todos machos). A atorvastatina e a sinvastatina foram adquiridas comercialmente em comprimidos sendo necessária sua diluição em água. O valproato de sódio foi adquirido comercialmente na forma de Valpakine® 200mg/mL.

No dia 29 PN, os animais foram avaliados em testes comportamentais para avaliação do comportamento social, atividade locomotora, comportamento estereotípico e comportamento repetitivo. No dia 29 PN após o último teste comportamental os animais foram eutanasiados por decapitação, em que se retirou amostras de tecido cerebral dos animais prole pertencente aos 8 grupos de cada gênero de áreas envolvidas com o TEA (córtex cerebral e cerebelo) para a realização das análises bioquímicas, bem como, foram retiradas amostras de sangue dos animais para a posterior análise dos níveis plasmáticos de colesterol.

Após a indução do experimento, eutanásia, dissecação das amostras cerebrais e coleta de sangue, as mesmas foram armazenadas em tubos do tipo eppendorfs para a avaliação do nível plasmático de colesterol e parâmetros de estresse oxidativo, sendo amostras mantidas a - 80 °C até o momento da realização das avaliações.

5.3.5 Testes comportamentais

5.3.5.1 Teste do campo aberto

Teste de campo aberto é utilizado para avaliar a atividade locomotora. O teste é realizado em uma arena de 40 x 50 cm, cercado por paredes de 50 cm de altura, feitas de madeira compensada com uma parede de vidro frontal. O piso do campo aberto é dividido em 12 retângulos iguais por linhas pretas. O número de cruzamentos das linhas negras (*crossings*) e postura assumida pelos ratos com apoio sobre as patas traseiras, levantamento (*rearings*), foram registrados como atividade locomotora e exploratória, respectivamente (figura 11) (Schmitt e Hiemke, 1998).

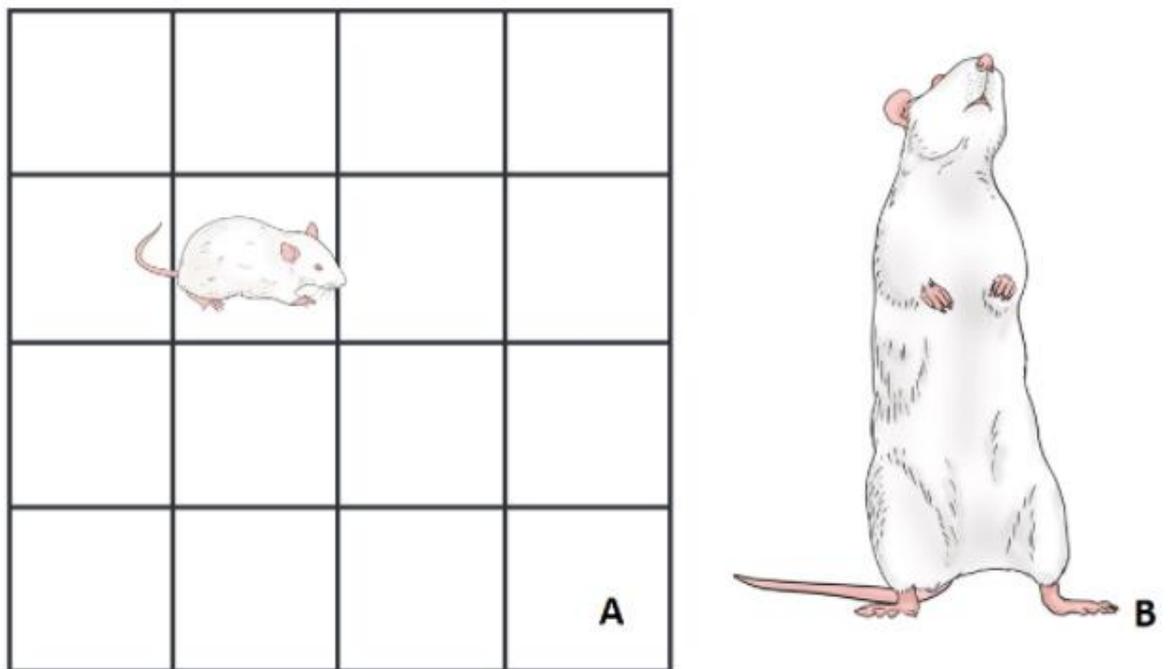


Figura 11: Desenho esquemático representativo do Teste do Campo Aberto (*Open Field*), representando os parâmetros de *crossings* (A) e *rearings* (B), avaliados no teste comportamental. (Fonte do autor).

5.3.5.2 Teste de interação social (Teste das 3 câmaras)

O teste de interação social baseia-se na tendência natural que os roedores têm de investigar animais considerados desconhecidos, intrusos. Este experimento, conforme descrito por Servadio *et al.* (2018) consiste em um aparato de acrílico separado em três câmaras com as

mesmas dimensões, possuindo aberturas entre elas que permitem o livre acesso entre as câmaras. Cada uma das câmaras laterais possui ainda uma pequena gaiola metálica com grades finas utilizadas para a acomodação dos ratos “estranhos” ao animal a ser testado.

Cada animal foi individualmente aclimatado por um período de 5 minutos no dia anterior ao teste comportamental. O teste consiste em duas etapas: inicialmente o rato testado é colocado na câmara central e deixado livremente por 5 minutos, após o qual é introduzido um animal estranho (rato 1) na câmara lateral localizada a esquerda dos pesquisadores sendo então abertas as comunicações entre as câmaras por 10 minutos. Imediatamente após estes 10 minutos, um segundo animal (rato 2) é colocado na câmara localizada a direita dos pesquisadores, permitindo-se ao animal em teste circular livremente por todo o aparato.

O aparato foi posicionado no centro da bancada do laboratório em uma posição que impedia que gradientes de luz ou temperatura induzissem a preferência do animal por uma das câmaras. A primeira etapa do teste, denominada socialização consistiu na quantificação da latência (intervalo de tempo em que o animal teste levava para interagir com o animal estranho), número de encontros e tempo de interação com o rato 1. A segunda etapa do teste, denominada novidade consistiu na introdução de um segundo animal estranho (rato 2), seguindo-se os mesmos parâmetros avaliados (Figura 12).

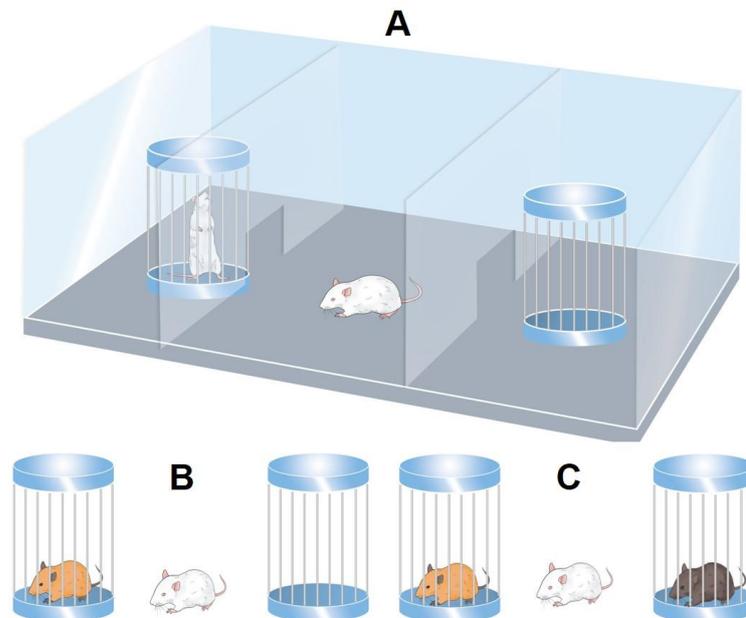


Figura 12: Desenho esquemático representativo do Teste das Três Câmaras, representando o aparato utilizado (A), o parâmetro de socialização (B) e novidade (C), avaliados como indicativos de interação social. (Fonte do autor).

5.3.5.3 Teste das bolas de gude – *Marble burying*

Teste para avaliação do comportamento obsessivo-compulsivo e movimentos repetitivos. Utilizando as caixas/gaiolas, preenchidas com maravalha limpa e inodora (5cm de altura, superfície nivelada) foram colocadas bolinhas de gude (lavadas e higienizadas previamente) alinhadas em 5 filas de 4 bolinhas, totalizando 20 bolinhas por caixa. O rato foi colocado no canto desta caixa, sem ser perturbado por 30 min e vídeos foram gravados para posterior análise. Após os 30 min, foi contado quantas bolinhas de gude estavam enterradas, em intervalos de 10, 20 e 30 min. Contabilizou-se como enterrada se dois terços das bolinhas estiver coberta pela maravalha (Figura 13) (Aljunied e Frederickson, 2013).

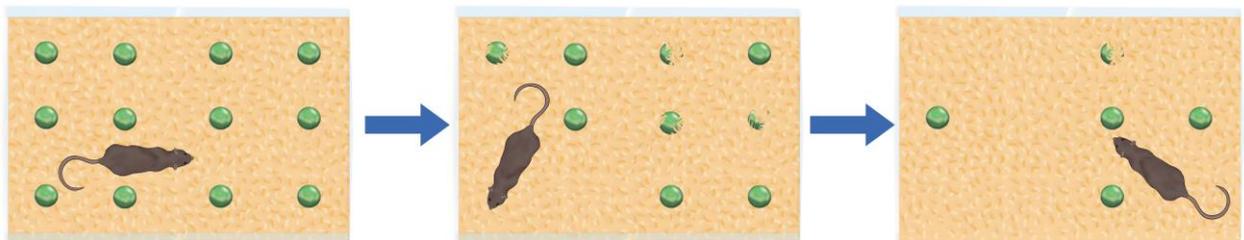
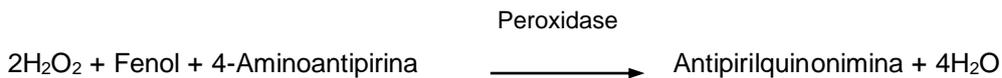
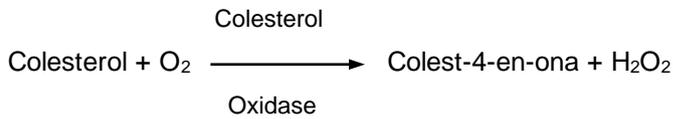
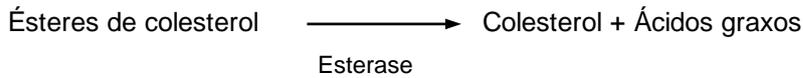


Figura 13: Desenho esquemático representativo do Teste das bolas de gude (Fonte do autor).

5.3.6 Dosagem de colesterol plasmático

Após a conclusão dos testes comportamentais, no 30º dia, os ratos foram eutanasiados por decapitação e tiveram seu sangue coletado para a dosagem sérica de colesterol total. As dosagens de colesterol total no soro dos animais foram feitas com base na metodologia proposta por Allain *et al.* (1974) (Allain *et al.*, 1974) utilizando-se o kit enzimático da marca *Liquiform* (Catálogo 76-2/100, Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa – MG). Para a realização da técnica de dosagem de colesterol plasmático, utilizou-se três tubos de ensaio. Em todos os tubos foi adicionado 1,0 mL de Reagente 1. O Tubo 1 permaneceu somente com esse reagente, sendo então o Branco. No Tubo 2, foi adicionado também 0,01 mL de amostra, sendo o Teste, e em outro tubo, foi 0,01 mL de Padrão (nº 2). Os tubos foram agitados e colocados em banho-maria 37 °C por 10 minutos. Para a leitura, o equipamento foi zerado com o branco e as absorbâncias do teste e do padrão foram determinadas em 500 nm. Por fim, o cálculo seguiu-se da seguinte forma: absorbância do teste dividido pela absorbância do padrão, multiplicado por 200, sendo o resultado expresso em mg/dL. De acordo com essa metodologia, o colesterol total é determinado nas amostras de soro de acordo com as seguintes reações:



Essas reações resultam na cor vermelha, cuja intensidade de cor é proporcional à concentração de colesterol na amostra. As leituras de absorbância foram então realizadas a $\lambda = 500 \text{ nm}$ através de um espectrofotômetro.

5.3.7 Estresse oxidativo

Após a conclusão dos testes comportamentais, no 30º dia, os ratos foram eutanasiados por decapitação e o cérebro dissecado em: córtex e cerebelo, de acordo com o método descrito por Glowinski e Iversen (1966).

A partir do homogenato das regiões cerebrais acima citadas, os seguintes testes bioquímicos foram conduzidos: TBA-RS, DCFH, SH e SOD.

5.3.7.1 Atividade da Superóxido Dismutase (SOD)

Amostras cerebrais (córtex e cerebelo) foram homogeneizadas em tampão de glicina. A atividade da SOD foi determinada pela inibição da autoxidação da adrenalina segundo Bannister e Calabrese (1987). Foi utilizado 10, 30 e 50 μL da amostra (homogeneizado em tampão catalase) e adicionado 10 μL de catalase (0,0024g/ml de água destilada), 970 μL de tampão glicina (0,75g em 200mL de água destilada – 32°C), 17 μL de adrenalina (60 mM em água destilada + 15 $\mu\text{L}/\text{ml}$ de HCl fumegante). A leitura foi realizada em 180 segundos com intervalo de 10 segundos, medida espectrofotometricamente a 480nm e os valores foram expressos em Unidade de SOD por miligrama de proteína (U/mg proteína).

5.3.7.2 Determinação da concentração da 2',7'-diclorofluoresceína - DCFH

O homogeneizado de tecido cerebral (córtex e cerebelo) foram utilizadas analisar a concentração da 2',7'-diclorofluoresceína – DCFH. A produção de hidroperóxidos foi determinada pela oxidação intracelular de diacetato 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH-DA) por espécies reativas de oxigênio (ERO). A formação do derivado fluorescente oxidado foi monitorada nos comprimentos de onda de excitação e emissão de 488 e 525nm, respectivamente, usando um espectrofotômetro de fluorescência como descrito anteriormente por Lebel et al. (1990).

5.3.7.3 Determinação da concentração de Sulfidrilas (SH)

Resíduos de aminoácidos – as cisteínas – que contêm sulfidrilas (SH) nas proteínas, são alvos suscetíveis a uma variedade de pró-oxidantes. Em diferentes tecidos, as células, incluindo o cérebro, possuem um sistema que regula o status redox dos tióis celulares e protegem as proteínas que contêm SH contra oxidação excessiva. Os radicais sulfidrilas (SH) representam todos os grupos tióis, portanto, conforme descrito por Aksenov e Markesbery (2001). Para a análise do teor de tiol total e ligado às proteínas, as amostras (Pré-frontal, Córtex e Cerebelo) foram processadas e suspensas em solução salina tamponada com fosfato (PBS, pH, 7,5) contendo inibidores de protease: leupeptina (0,5mg / ml), pepstatina (0,7 mg / ml), inibidor de tripsina de soja do tipo IIS (0,5 mg / ml) e fluoreto de fenilmetanossulfonil (40 mg / ml). O conteúdo total de tiol foi determinado usando 5,50-ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico) e quantificado de acordo com a absorvância a 412 nm usando um espectrofotômetro.

5.3.7.4 Formação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS)

A peroxidação lipídica foi analisada através da formação de TBA-RS (155). As amostras de tecido cerebral foram lavadas com PBS, colhidas e lisadas. As espécies reativas foram obtidas por hidrólise ácida de 1,1,3,3-tetra-etoxi-propano (TEP) e foram utilizadas como padrão para a quantificação de TBA-RS. A cada tubo foi adicionado TBA a 0,67% e em seguida agitados. A mistura da reação foi incubada a 90° C durante 20 min e posteriormente as amostras colocadas em gelo. A densidade óptica de cada solução foi medida em um espectrofotômetro a 535 nm. Os dados foram expressos como nmol de equivalentes malondialdeído (MDA) por mg de proteína (Cheeseman, 1990).

5.3.8 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas no programa SPSS e os gráficos construídos utilizando o programa Graphpad versão 10.0. Para as comparações entre os grupos utilizou-se a análise de variância *one-way* ANOVA, seguido do teste *post hoc* de Duncan para os resultados comportamentais e teste *post hoc* de Tukey para os resultados bioquímicos. O critério de significância utilizado foi de $p < 0,05$. Os asteriscos (* $p < 0,5$; ** $p < 0,01$) caracterizam o grau de significância.

5.4 RESULTADOS

5.4.1 Avaliação comportamental

5.4.1.1 Avaliação de atividade locomotora no teste do campo aberto

No DPN 30, foi avaliada a atividade locomotora espontânea dos ratos machos jovens e os dados estão apresentados nas figuras 14 e 15. Foram registrados os dados referentes ao número de cruzamentos (*crossings*) (A) e o número de levantamentos (*rearings*) (B), com propósito de verificar a hiperatividade e movimentos estereotipados. Os dados coletados e analisados demonstraram uma redução estatisticamente significativa no número de cruzamentos no grupo ATV e ATV + VPA quando comparado ao grupo controle ($F_{1,34} = 0,2465$; $p = 0,035948$ do grupo ATV e $F_{1,34} = 0,2465$; $p = 0,002415$, do grupo ATV + VPA). Quanto ao número de levantadas, houve uma diminuição significativa no grupo VPA + ATV ($F_{1,37} = 0,1834$; $p = 0,046900$) e uma tendência a diminuição no grupo ATV ($F_{1,37} = 0,1834$; $p = 0,062532$), quando comparados ao grupo controle.

Os resultados da avaliação comportamental dos animais administrados com VPA + SVT também mostraram uma diminuição significativa no número de cruzamentos ($F_{1,36} = 0,0148$; $p = 0,002632$) e VPA sozinho mostrou uma tendência a diminuição deste parâmetro, quando comparado ao grupo controle ($F_{1,36} = 0,0148$; $p = 0,071859$) (figura 15A). Quanto ao número de levantamentos, houve uma diminuição no grupo VPA + SVT ($F_{1,37} = 2,3280$; $p = 0,001293$) quando comparado a todos os grupos (figura 15 B).

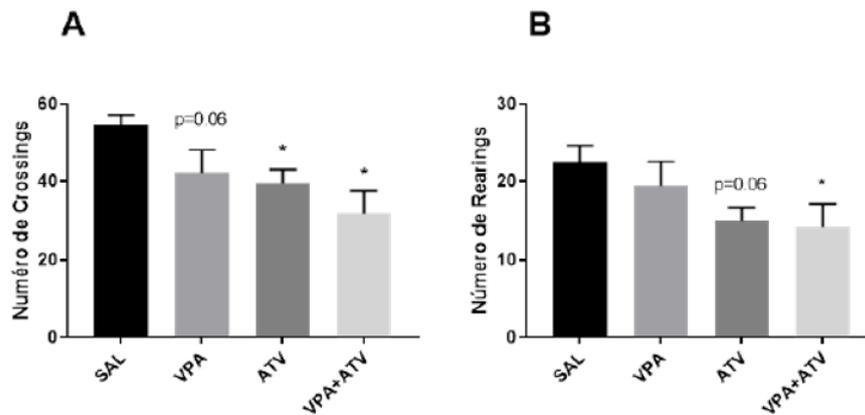


Figura 14: Efeito da exposição pré-natal ao VPA, no comportamento locomotor dos animais testados (n=12 animais/grupo). Os dados coletados estão representados nas figuras: (A) número de cruzamentos do animal (B) número de levantamentos (*rearing*s). Dados expressos como média \pm desvio padrão da média (DPM). As análises estatísticas foram realizadas através da análise de variância one-way ANOVA, seguido do teste de *post hoc* de Duncan.

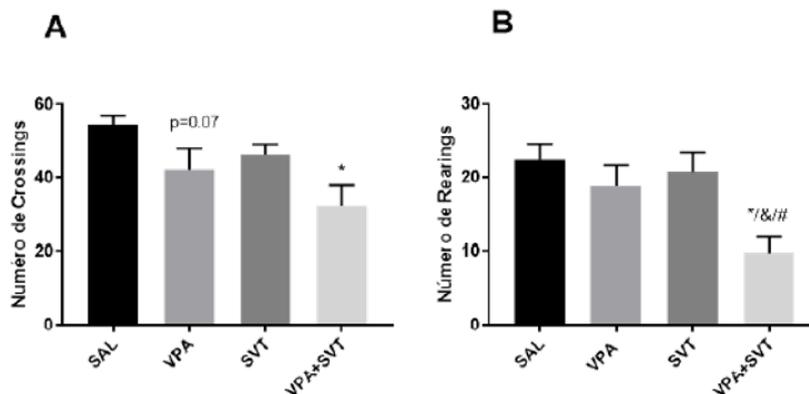


Figura 15: Efeito da exposição pré-natal ao VPA e posterior tratamento com estatinas no comportamento locomotor dos animais testados (n=12 animais/grupo). Os dados coletados estão representados nas figuras: (A) número de cruzamentos do animal (B) número de levantamentos (*rearing*s). Dados expressos como média \pm desvio padrão da média (DPM). As análises estatísticas foram realizadas através da análise de variância one-way ANOVA, seguido do teste de *post hoc* de Duncan.

5.5.1.2 Teste da Interação Social

No DPN 29, ratos machos jovens, foram colocados individualmente em uma caixa de acrílico para interagir com outro animal (do mesmo sexo e grupo experimental), com objetivo de verificar o comportamento de interação social (figura 16 e 17). Os animais permaneceram na área de testes por 10 minutos e os dados de latência para o primeiro encontro (A), número de encontros com o rato 1 (B) e tempo de interação com o rato 1 (C), foram registrados. Com relação aos animais administrados com ATV, como esperado, os animais do grupo VPA apresentaram uma tendência a um maior tempo de latência ao primeiro encontro

($F_{1,41} = 0,05719$; $p = 0,08$) (fig 16A) e um menor número de encontros com o rato estranho ($p < 0,05$) (fig 16B) quando comparados aos animais do grupo controle (fig 16). Nenhuma outra alteração significativa nos grupos ATV expostos foi observada, quando comparado ao grupo controle.

Similarmente aos dados estatísticos encontrados no tratamento com ATV, no tratamento com STV, os animais do grupo VPA apresentaram uma tendência ao aumento do tempo de latência ($F_{1,38} = 4,88332$ e $p = 0,06$) ao primeiro encontro, uma diminuição significativa no número de encontro com o rato estranho ($F_{1,37} = 1,5179$; $p = 0,011390$) e uma diminuição no tempo total com o rato estranho ($F_{1,38} = 0,2289$, $p = 0,031898$) quando comparados aos animais do grupo controle (fig 17). Em relação ao grupo de animais VPA+SVT, os dados demonstram que os animais apresentaram uma diminuição significativa do tempo de latência no primeiro encontro ($F_{1,38} = 4,88332$; $p = 0,004517$) quando comparados aos animais do grupo VPA (figura 17A). Além disso, os animais do grupo VPA+SVT apresentam uma tendência ao aumento do tempo total com o rato estranho ($F_{1,38} = 0,2289$; $p = 0,080967$) (fig. 17C).

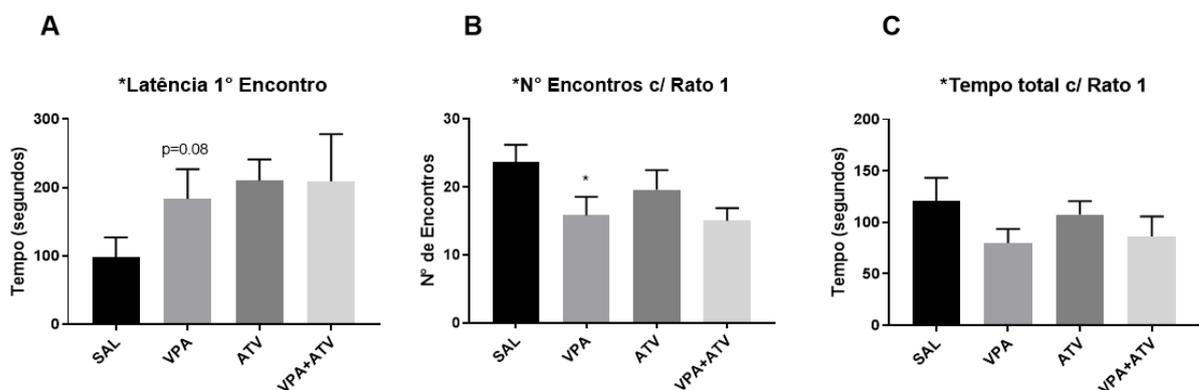


Figura 16: Efeito da exposição pré-natal ao VPA e posterior tratamento com estatinas no comportamento de interação social dos animais testados. Os animais foram levados individualmente a interagir com outro animal desconhecido do mesmo sexo em uma caixa de acrílico. Os ratos foram pareados e inseridos na área de testes por 10 minutos ($n=12$ animais/grupo). Os dados coletados estão representados nas figuras: (A) Latência (segundos) – representa tempo de repouso do animal antes da primeira movimentação; (B) Número de encontros – representa o total de encontros entre os animais pareados e, (C) Tempo total Encontros (segundos) – representa o tempo total gastos nos encontros. Dados expressos como média \pm desvio padrão da média (DPM). As análises estatísticas foram realizadas através da análise de variância one-way ANOVA, seguido do teste de post hoc de Duncan, * $P < 0,05$.

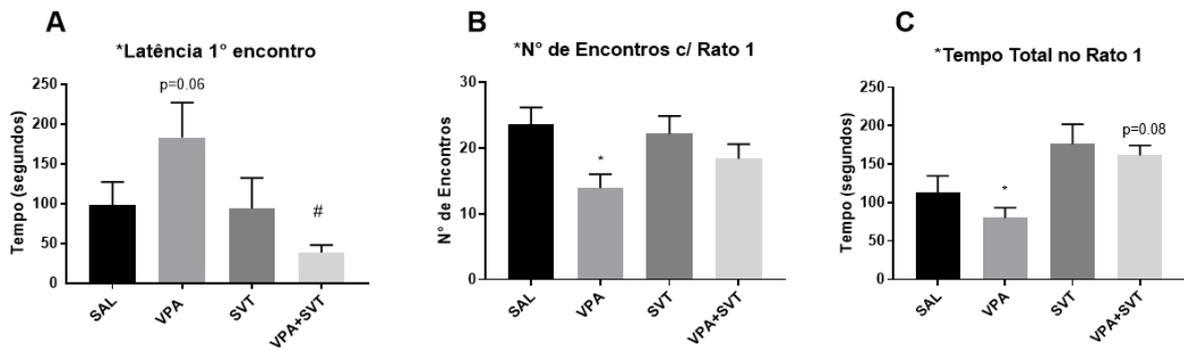


Figura 17: Efeito da exposição pré-natal ao VPA e posterior tratamento com estatinas, no comportamento de interação social dos animais testados. Os animais foram levados individualmente a interagir com outro animal desconhecido do mesmo sexo em uma caixa de acrílico. Os ratos foram pareados e inseridos na área de testes por 10 minutos (n=12 animais/grupo). Os dados coletados estão representados nas figuras: (A) Latência (segundos) – representa tempo de repouso do animal antes da primeira movimentação; (B) Número de encontros – representa o total de encontros entre os animais pareados e, (C) Tempo total Encontros (segundos) – representa o tempo total gastos nos encontros. Dados expressos como média \pm desvio padrão da média (DPM). As análises estatísticas foram realizadas através da análise de variância one-way ANOVA, seguido do teste de post hoc de Duncan, *P < 0,05 e #P < 0,05, quando comparados ao grupo VPA + SAL.

5.5.1.3 Teste das bolas de gude – *Marble burying*

No DPN 30, foi realizada a avaliação do comportamento obsessivo-compulsivo e movimentos repetitivos dos ratos machos jovens e os dados estão apresentados na figura 18. Foram registrados os números de bolas de gude enterradas em intervalos de 10, 20 e 30 minutos.

Analisando os dados dos animais do grupo ATV, os animais do grupo controle apresentaram um maior número de bolas enterradas nos tempos de 20 ($F_{1,82} = 5,2617$; $p = 0,000150$) e 30 minutos ($F_{1,82} = 5,2617$; $p = 0,000119$), quando comparados aos demais grupos analisados. Não foram observadas outras alterações significativas nos demais grupos testados.

Ao verificar os dados estatísticos dos animais do grupo STV, nota-se similaridade com os dados do tratamento com ATV, visto que, os animais do grupo controle apresentaram um maior número de bolas enterradas nos tempos de 20 ($F_{1,88} = 4,8483$; $p = 0,000182$) e 30 minutos ($F_{1,88} = 4,8483$; $p = 0,000017$) quando comparados aos demais grupos analisados. Os demais grupos não apresentaram alterações significativas.

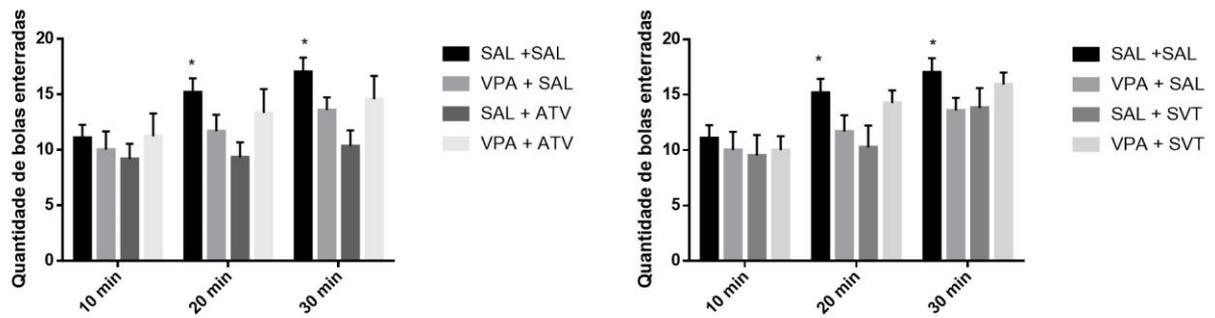


Figura 18: Efeito da exposição pré-natal ao VPA e posterior tratamento com estatinas, no teste das bolas de gude. Os animais foram individualmente colocados no canto desta caixa, sem serem perturbados por 30 min e vídeos foram gravados para posterior análise. Após os 30 min, foram contados quantas bolinhas de gude estavam enterradas, em intervalos de 10, 20 e 30 min. Dados expressos como média \pm desvio padrão da média (DPM). As análises estatísticas foram realizadas através da análise de variância one-way ANOVA, seguido do teste de post hoc de Duncan, * $P < 0,05$.

5.4.2 Dosagem dos níveis plasmáticos de colesterol

Visando entender a relação entre o TEA e os níveis plasmáticos de colesterol, realizou-se a dosagem nos níveis plasmáticos da macromolécula nos grupos tratados no presente estudo, conforme demonstram as figuras 19 e 20.

Em relação ao tratamento com ATV, verificou-se que o grupo VPA + ATV apresentou níveis elevados de colesterol plasmático ($F_{1,21}=4,334$; $p=0,42255$) quando comparado com o grupo ATV, sem nenhuma outra alteração significativa entre os grupos estudados. Entretanto, ao analisar o tratamento SVT, observa-se que os animais do grupo STV apresentam uma dosagem significativamente maior dos níveis de colesterol plasmático ($p < 0,05$), quando comparados ao grupo controle, sem alterações significativas nos demais grupos estudados.

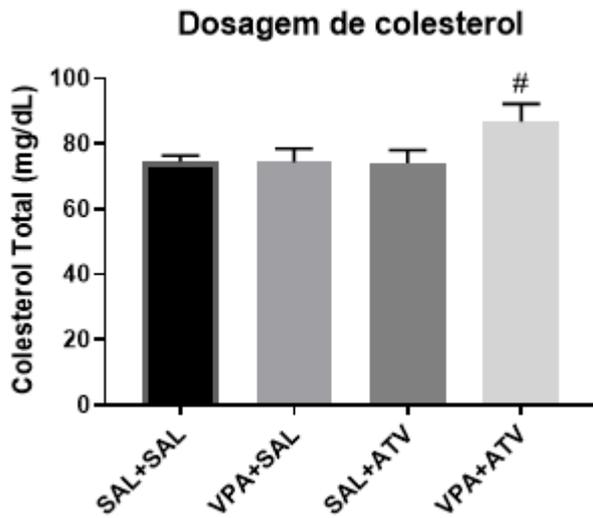


Figura 19: Efeitos da atorvastatina sobre o colesterol total em um modelo animal de autismo induzido por VPA. O colesterol total foi elevado no grupo VPA+ATV em comparação com o grupo ATV. O dado do colesterol total é expresso como média \pm DPM ($n = 7$ animais por grupo). # $p < 0,05$ comparado aos animais ATV (ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Tukey).

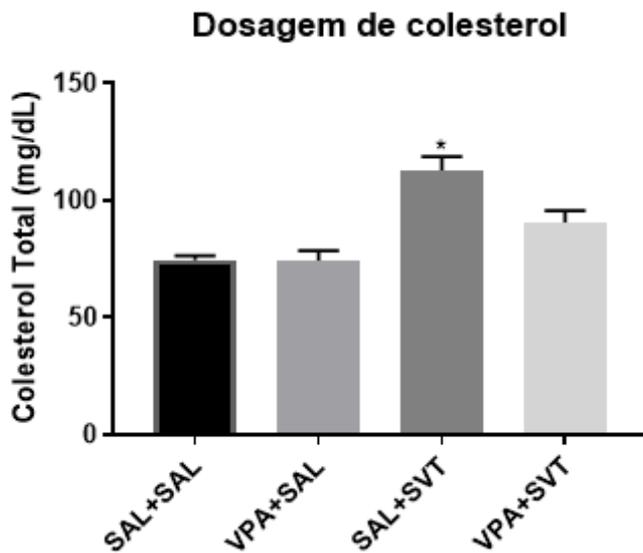


Figura 20: Efeitos da sinvastatina sobre o colesterol total em um modelo animal de autismo induzido por VPA. O colesterol total foi elevado no grupo ATV em comparação com o grupo controle. O dado do colesterol total é expresso como média \pm DPM ($n = 7$ animais por grupo). # $p < 0,05$ comparado aos animais controle (ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Tukey).

5.4.3 Estresse oxidativo

5.4.3.1 Atividade da Superóxido Dismutase (SOD) em córtex e cerebelo

Neste estudo, avaliou-se a atividade da SOD, no homogeneizado cerebral das regiões do córtex (A) e cerebelo (B), e os resultados estão apresentados na figura 21.

Verificando os dados relativos ao tratamento com ATV, tanto na estrutura de córtex ($F_{1,14}=0,1803$; $p=0,077640$) (figura 21A), quanto no cerebelo ($F_{1,19}=0,1055$; $p=0,972554$) (figura 19B), não se observam alterações significativas atividade da SOD, quando comparados aos dados do grupo controle ($p<0,05$). Não foram observadas demais alterações nos outros grupos estudados.

Os resultados são semelhantes no tratamento com SVT, onde também não foram observadas alterações significativas em córtex ($F_{1,14}=0,8789$; $p=0,550528$) (figura 21A) e cerebelo ($F_{1,18}=4,0828$; $p=0,893932$) (figura 21B), quando comparados ao grupo controle. Nenhuma outra alteração foi verificada nos demais grupos.

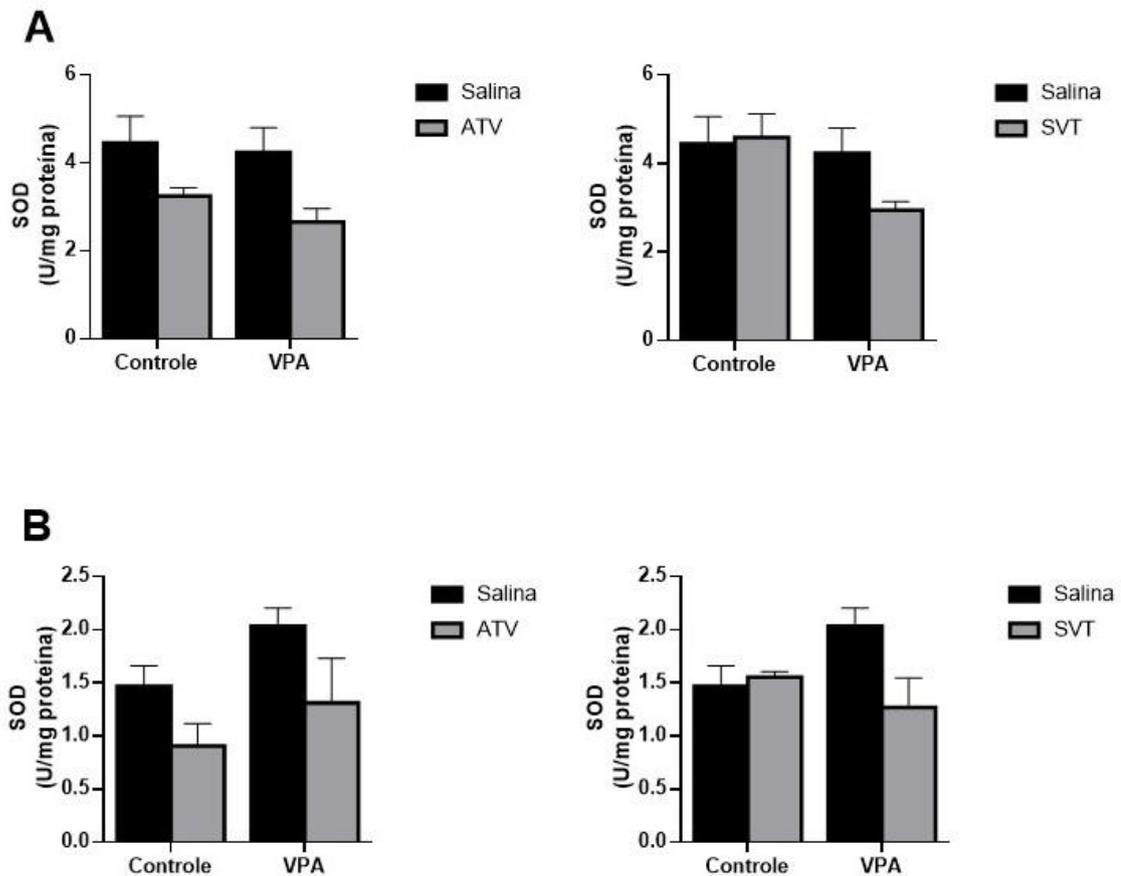


Figura 21: Efeito da exposição pré-natal ao VPA, e posterior tratamento com **estatinas** (ATV e SVT), na concentração de Superóxido Dismutase (SOD), no cérebro em região de córtex (A) e cerebelo (B) dos animais testados (n=4-8 animais/grupo). A atividade da SOD foi avaliada medindo a inibição da autooxidação da adrenalina com absorbância a 480 nm. Dados expressos como média \pm desvio padrão da média (DPM). As análises estatísticas foram realizadas através da análise de variância one-way ANOVA, seguido do teste de post hoc de Tukey.

5.4.3.2 Níveis de DCFH em córtex e cerebelo

Os níveis de oxidação de DCFH são indicadores da produção de espécies reativas, especialmente peróxido de hidrogênio. A produção de ERO foi mensurado com base na oxidação da sonda DCFH-DA em composto fluorescente da DCF em amostra cerebral. Os dados estão apresentados na figura 22.

Os dados referentes ao tratamento com ATV, não apresentam alterações significativas dos níveis de DCF, tanto em córtex ($F_{1,20}=0,003$; $p=0,920251$) (figura 22A), quanto no cerebelo ($F_{1,18}=0,008$; $p=0,000842$) (figura 20B), quando comparados aos dados do grupo controle ($p<0,05$). Demais alterações não foram observadas nos grupos estudados.

Os resultados do tratamento com SVT vão ao encontro dos resultados do tratamento com ATV. Nas estruturas analisadas, córtex ($F_{1,20}=2,169$; $p=0,811755$) (figura 22A) e cerebelo

$F_{1,20}=0,507$; $P=0,000325$) (figura 22B), quando comparados ao grupo controle, não se observaram alterações significativas dos níveis de DCF. Nenhuma outra alteração foi verificada nos demais grupos.

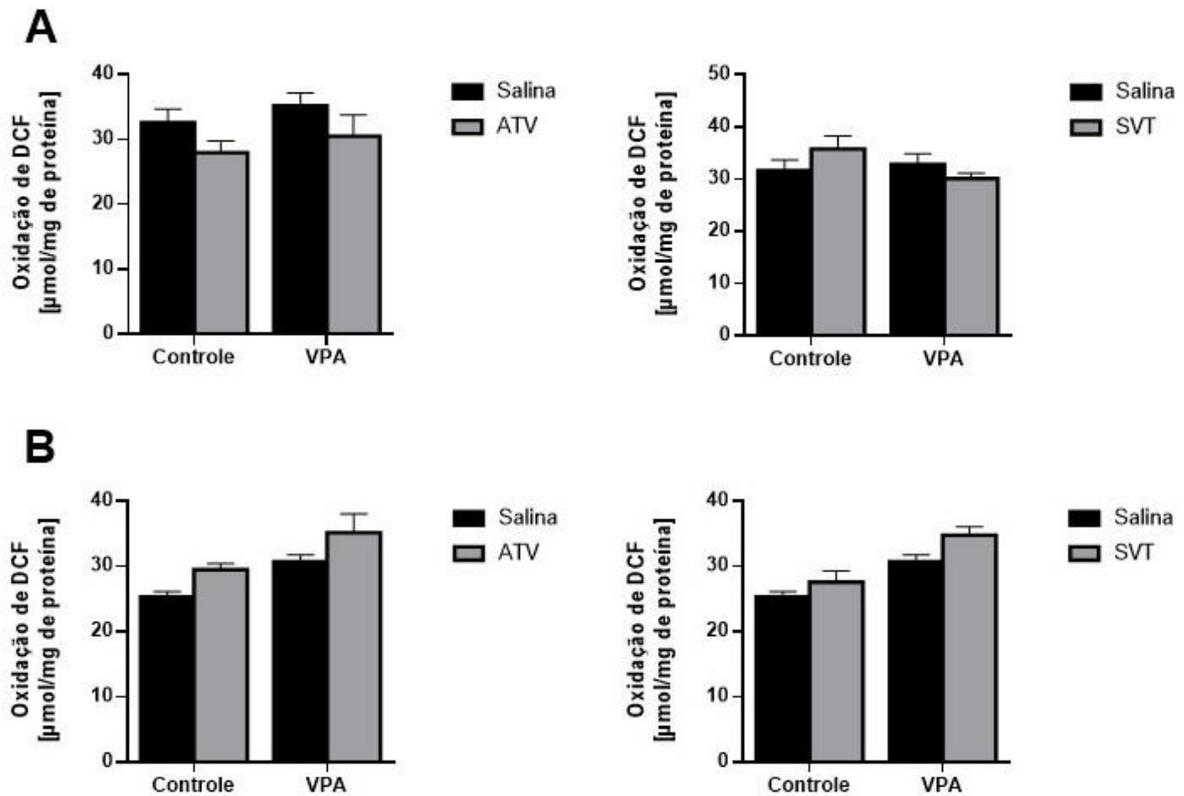


Figura 22: Efeito da exposição pré-natal ao VPA, e posterior tratamento com estatinas (ATV e SVT), na concentração de DCF, no cérebro em região de córtex (A) e cerebelo (B) dos animais testados ($n=4-8$ animais/grupo). Dados expressos como média \pm desvio padrão da média (DPM). As análises estatísticas foram realizadas através da análise de variância one-way ANOVA, seguido do teste de post hoc de Tukey.

5.4.3.3 Concentração de Sulfidrilas região de córtex e cerebelo

Os dados da figura 23, representam os níveis de oxidação de proteína tiol (sulfidrilas -SH) para as regiões do córtex (A) e cerebelo (B), representados nos gráficos através da concentração de sulfidrilas.

Analisando as estatísticas do tratamento com ATV, não houve nenhum tipo de alteração significativa em córtex ($F_{1,17}=1,1911$; $p=0,978953$) (figura 23A) quando comparado todos os grupos, enquanto que se observa uma diminuição da concentração de sulfidrilas, em cerebelo, no grupo VPA+ATV, quando comparado ao grupo VPA ($F_{1,17}=7,5661$; $p=0,015962$) (figura 23B). Demais alterações não foram observadas.

Já em relação ao tratamento com SVT, não foram encontradas alterações significativas em córtex ($F_{1,17}=0,4708$; $P=0,756235$) (figura 23A) e cerebelo ($F_{1,18}=5,8762$; $p=0,994115$) (figura 21B), quando comparados os grupos estudados no presente estudo.

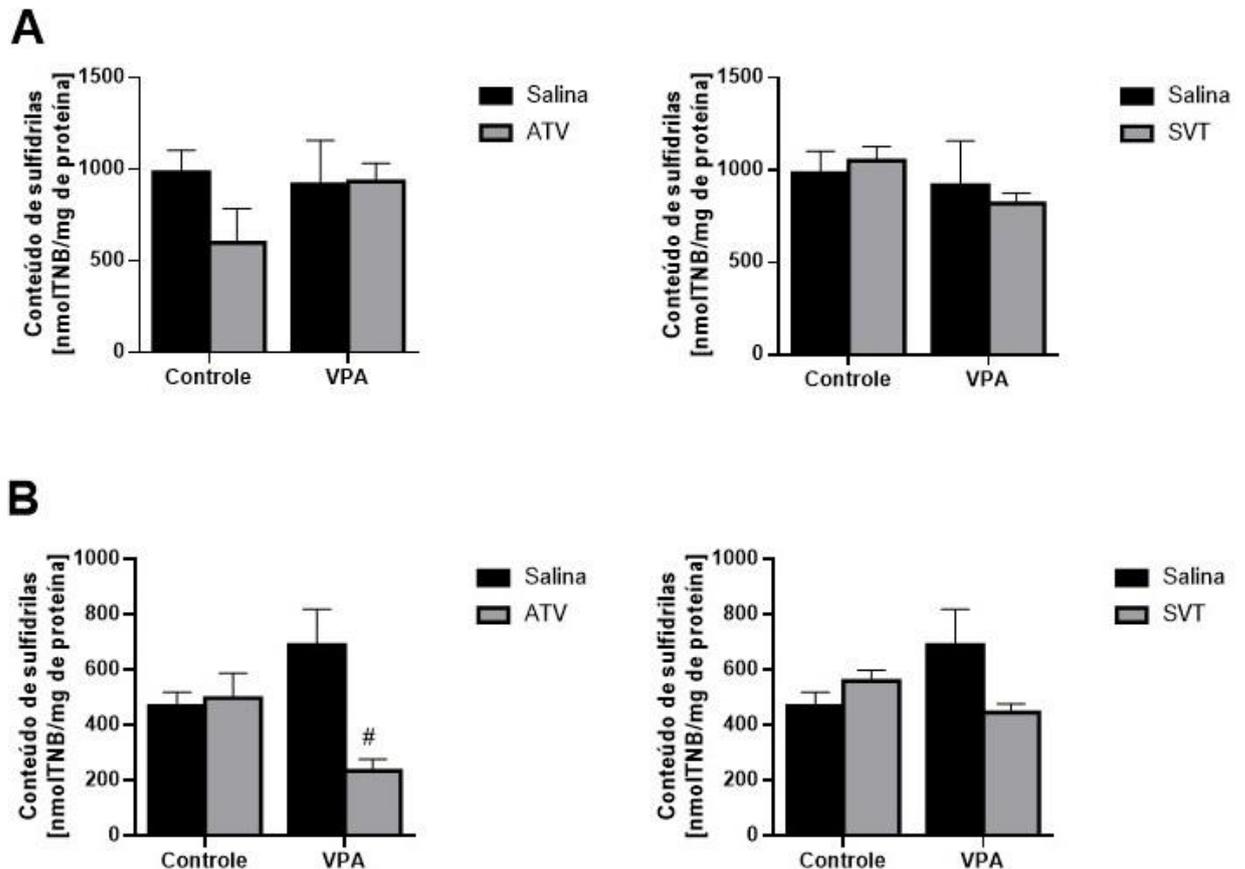


Figura 23: Efeito da exposição pré-natal ao VPA, e posterior tratamento com estatinas (ATV e SVT) na concentração de Sulfidrilas (SH) no cérebro em região de córtex (A) e cerebelo (B) dos animais testados (n=4-8 animais/grupo). A oxidação de grupamentos Sulfidrilas (dano proteico) foi determinada mediante a quantificação do teor de tiol total ligado às proteínas. As análises estatísticas foram realizadas através da análise de variância one-way ANOVA, seguido do teste de post hoc de Tukey, # $P < 0,05$, quando comparados ao grupo VPA + SAL.

5.4.3.4 Medida dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) em córtex e cerebelo

Os dados da figura 24, representam os níveis de concentração de TBA-RS para as regiões do córtex (A) e cerebelo (B), indicando a peroxidação lipídicas nas estruturas analisadas. De acordo com os dados do tratamento com ATV, na estrutura do córtex, não houve alteração significativa dos níveis de TBA-RS, quando comparados os grupos em questão ($F_{1,13}=2,8616$; $p=0,267447$) (figura 24A). Já no cerebelo, observa-se que o grupo VPA+ATV

apresentou uma reversão dos altos níveis de TBA-RS, quando comparado ao grupo VPA ($F_{1,18}=2,3832$; $p=0,004487$) (figura 24B).

Entretanto, observando o tratamento com SVT, não foram encontradas alterações significativas em córtex ($F_{1,20}=0,0209$; $p=0,996320$) (figura 24A) e cerebelo ($F_{1,18}=3,7498$; $p=0,869310$) (figura 24B), quando comparados os grupos estudados.

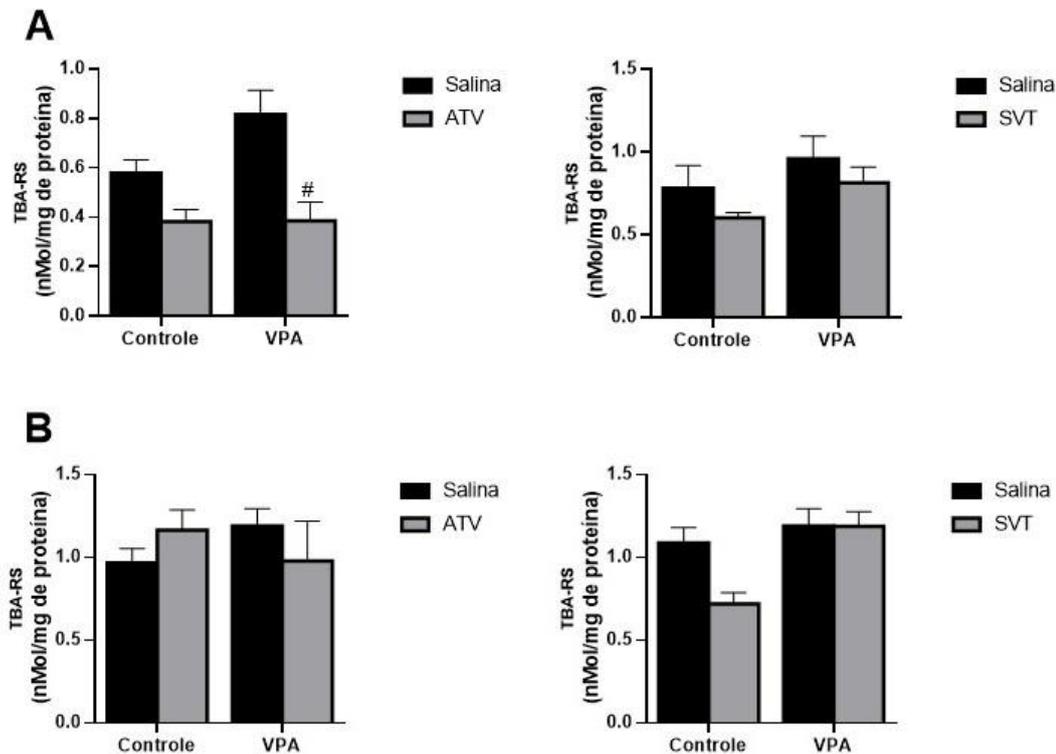


Figura 24: Efeito da exposição pré-natal ao VPA, e posterior tratamento com estatinas (ATV e SVT), na concentração de TBA-RS, no cérebro em região de córtex (A) e cerebelo (C) dos animais testados ($n=4-8$ animais/grupo). Dados expressos como média \pm desvio padrão da média (DPM). As análises estatísticas foram realizadas através da análise de variância one-way ANOVA, seguido do teste de post hoc de Tukey, $\#P < 0,05$, quando comparados ao grupo VPA + SAL.

5.5 DISCUSSÃO

Como pode-se observar até este ponto, o TEA é um distúrbio neuropsiquiátrico com base biológica significativa, de desenvolvimento precoce, apresentando uma infinidade de fatores etiológicos associados. Tamanha complexidade limita muito o estudo da fisiopatologia do autismo em seres humanos.

Ao utilizar métodos de investigação neurofisiológica com eletroencefalografia ou magnetoencefalografia, é possível a obtenção apenas de dados indiretos e inespecíficos acerca do equilíbrio excitatório/inibitório do SNC. Apenas na última década se tornou possível a

avaliação *in vivo* dos níveis de glutamato e GABA no SNC, através da utilização da ressonância magnética associada a espectroscopia por emissão de pósitrons. Tal método, devido ao seu elevado custo e a necessidade de anestesia geral, torna a sua aplicação dificilmente justificável para fins de pesquisa em grande escala (Ruggeri *et al.*, 2014).

Dessa forma, a utilização de modelos animais torna factível o estudo das alterações comportamentais encontradas no TEA, além da sua relação com a exposição pré-natal à intoxicantes e agentes ambientais, permitindo ainda o estudo direto dos mecanismos bioquímicos relacionados. De fato, grande parte dos avanços alcançados na compreensão da fisiopatologia do TEA e no desenvolvimento de terapêuticas é atribuído aos modelos animais. Estes modelos de transtornos neurológicos amplamente utilizados, são desenvolvidos para obter uma visão e fazer previsões do TEA em humanos (Hrabovska e Salyha, 2016). Fundamentando o desenvolvimento de modelos animais, dados epidemiológicos e experimentais mostram que a exposição pré-natal a intoxicantes exógenos e, dentre estes, a exposição a medicamentos como anticonvulsivantes, durante o período gestacional podem alterar o desenvolvimento cerebral resultando em anormalidades comportamentais e déficit cognitivo (Schlickmann e Fortunato, 2013).

Dentre os medicamentos anticonvulsivantes, o VPA tem sido utilizado, há décadas, como medicação anticonvulsivante e como estabilizador do humor sendo que, desde o início, a sua utilização tem trazido preocupações acerca dos possíveis efeitos teratogênicos, quando utilizada durante o período gestacional. Estudos clínicos identificaram diversos riscos associados ao uso do VPA durante o período gestacional, incluindo malformações congênitas, atraso no desenvolvimento neurológico, déficit cognitivo e também um risco aumentado para o desenvolvimento de TEA. Em se tratando do autismo, Rasalm *et al.* (2005) demonstraram que o VPA é a medicação mais comumente relacionada ao autismo uma vez que 8,9% das crianças expostas ao VPA durante a gestação apresentaram sintomas compatíveis com TEA.

Entre os modelos animais que utilizam agentes teratogênicos como fatores de risco para o autismo, o VPA é o mais extensamente estudado e reproduzido. Baseia-se na exposição de ratas prenhas ao VPA no 9º dia gestacional, afetando a migração de neurônios serotoninérgicos ou no 12º dia de gestação, podendo afetar os mecanismos de diferenciação neuronal. Essa exposição não produz anormalidades neuroanatômicas, no entanto, os filhotes expostos apresentam alterações comportamentais (diminuição da interação social, aumento de comportamentos repetitivos e estereotipados, atrasos no desenvolvimento neurológico e alterações na sensibilidade) que mimetizam àquelas encontradas em pacientes com TEA

(Schneider e Przewlocki, 2005). Assim, este foi o modelo animal selecionado para a realização deste estudo, avaliando-se os efeitos do tratamento com duas diferentes estatinas em parâmetros comportamentais e de estresse oxidativo no cérebro de ratos jovens expostos no período pré-natal ao VPA.

Até o momento, não foram encontrados estudos avaliando os efeitos da administração de estatinas em modelos animais de TEA, dessa forma, utilizou-se como base os protocolos de administração de estatinas em modelos animais de epilepsia. De acordo com Piermartiri *et al.* (2010) a administração de ATV e SVT via gavagem, por um período de sete dias foi capaz de prevenir a morte celular, reduzir parâmetros inflamatórios e de estresse oxidativo em ratos expostos a ácido quinolínico como forma de induzir crises convulsivas (Piermartiri *et al.*, 2010; Piermartiri *et al.*, 2009).

Em seres humanos, o TEA é diagnosticado clinicamente a partir da presença de sintomas associados ao comprometimento da comunicação e da interação social, associados a presença de um repertório de interesses e comportamentos restritos e repetitivos (Hodges *et al.*, 2020). Sabe-se que os ratos são uma espécie altamente social exibindo um conjunto notável de comportamentos sociais, que servem como modelos de investigação do TEA, mimetizando muitas das categorias observadas em seres humanos e que são acessíveis através de testes padronizados (Schroeder *et al.*, 2017).

Antes da realização de testes comportamentais específicos que avaliassem a interação social e a presença de comportamentos repetitivos, porém, foi avaliada a condição motora dos animais através do teste do campo aberto. A sua aplicação é realizada com o intuito de se avaliar a motricidade dos animais.

Os animais tratados com as estatinas (tanto ATV quanto a SVT) apresentaram valores estatisticamente menores nos números de cruzamentos e levantamentos quando comparados aos controles ou aos animais expostos prenatalmente ao VPA. A título de comparação, os estudos de Piermartiri *et al.* (2009) que avaliaram os efeitos das estatinas em modelos animais de epilepsia, não realizaram testes de avaliação locomotora.

Entretanto, essa redução da atividade locomotora nos ratos tratados com estatinas pode ser explicada pelo menos em parte, por ser um efeito adverso relacionado ao uso das estatinas. De acordo com Ramachandran *et al.* (2017), sintomas musculares associados as estatinas (SMAE) são encontrados frequentemente na prática clínica (em cerca de 10 a 29% dos pacientes em uso de estatinas) e constituem um dos principais motivos da interrupção no tratamento (Ramachandran e Wierzbicki, 2017). Tais sintomas incluiriam principalmente

mialgias (dores musculares), fraqueza muscular, câimbras e sensação de peso; e, mais raramente, rbdomiólise (lesão das fibras musculares) e miosite (inflamação das fibras musculares) (Pedro-Botet *et al.*, 2016).

No presente estudo, a redução da atividade locomotora dos ratos foi maior naqueles tratados com SVT do que ATV. Estes dados vão ao encontro da literatura que indicam uma maior prevalência e gravidade de SMAEs em pacientes tratados com SVT do que com ATV (Turner e Pirmohamed, 2019).

O teste das três câmaras consiste em um aparato que permite avaliar a socialização do animal, avaliando-se a latência (intervalo de tempo até a primeira interação social), número de interações e o tempo de permanência em um ambiente com um animal estranho colocado em uma gaiola, comparando-se estes mesmos parâmetros em relação a uma câmara com um objeto não-social (uma gaiola vazia) (Silverman *et al.*, 2010). Quanto maior o tempo de permanência do animal testado na câmara contendo um animal estranho assim como quanto maior o número de interações, melhores é seu grau de socialização.

No presente estudo, os animais submetidos ao modelo animal de autismo, com exposição pré-natal ao VPA apresentaram um aumento significativo do tempo de latência de encontro com o rato 1; redução significativa no tempo de interação social e redução no tempo de permanência na câmara 1 em relação aos controles. Estes resultados corroboram os achados encontrados por Bronzuoli *et al.* (2018) e Sierra *et al.* (2011), que administraram a mesma dose de 500mg/kg de VPA, pela mesma via de administração e na mesma idade gestacional, encontrando redução nos níveis de sociabilidade na prole.

Os parâmetros de socialização avaliados (tempo de latência para o primeiro encontro, tempo de interação com o rato 1 e tempo total de permanência na câmara 1) apresentaram melhora após a administração de estatinas, tendo sido mais evidente uma melhora após o tratamento com a SVT que com a ATV, indicando que o tratamento com estatinas promoveu melhora nos parâmetros de socialização.

Essa diferença na resposta se deve a diferenças na composição das diferentes estatinas. Atualmente, existem nove diferentes fórmulas de estatinas comercialmente disponíveis, divididas em 3 classes: 1) derivados do fungo *Aspergillus terreus* (lovastatina); 2) semi-sintéticas (mevastatina, pravastatina e simvastatina) e; 3) sintéticas (cerivastatina, atorvastatina, fluvastatina, pitavastatina e rosuvastatina). Em 2011, Sierra *et al.* comparou as nove diferentes estatinas de acordo com parâmetros relacionados ao SNC como: capacidade de atravessar a barreira hemato-encefálica, potência na modulação do metabolismo do colesterol

através da inibição da HMGCoA redutase (mecanismo comum a todas as estatinas) e potencial neuroprotetor. Evidenciou-se que a SVT e a ATV eram as duas estatinas com maior capacidade de atravessar a BHE por serem as mais lipofílicas, sendo ainda que a simvastatina apresentava maior efeito modulador no metabolismo do colesterol e maior potencial neuroprotetor quando comparado a atorvastatina (Sierra *et al.*, 2011).

O teste das bolas de gude foi originalmente proposto como um modelo para a avaliação de sintomas ansiosos. Baseado no comportamento normal dos roedores em enterrar objetos considerados nocivos, verificou-se que tal comportamento era revertido pela administração de medicamentos ansiolíticos como os inibidores seletivos de recaptação de serotonina (ISRS) (Broekkamp *et al.*, 1986). Posteriormente, após uma análise mais cuidadosa, observou-se que o comportamento dos roedores em enterrar bolas de gude poderia estar muito mais relacionado a um comportamento obsessivo compulsivo que ansioso, uma vez que em situações adequadas, os animais não consideravam as bolas de gude como um estímulo aversivo ou objeto ameaçador (Njung'e e Handley, 1991). De acordo com Londei *et al.* (1998), o comportamento caracterizado por enterrar as bolas de gude iniciaria como uma atividade investigativa natural, entretanto, por ser um objeto não reativo, não ofereceria ao animal o estímulo necessário para encerrar a investigação, induzindo o comportamento obsessivo, como uma incapacidade de se atingir um senso de “tarefa cumprida”.

Indivíduos com TEA exibem um grande repertório de comportamentos repetitivos incluindo estereotípias, rituais, compulsões e obsessões com grande variabilidade individual e que, muitas vezes, são similares aos comportamentos exibidos por pessoas com transtorno obsessivo compulsivo (TOC) (Lord *et al.*, 2020). Dessa forma, o teste das bolas de gude tem sido largamente utilizado para a avaliação de comportamentos repetitivos em modelos animais de autismo. A exemplo disso, Mcfarlane *et al.* (2008) demonstraram que animais manipulados geneticamente (ratos da linhagem *black and tan brachyury* - BTBR) expressavam fenótipo autista como redução da interação social, diminuição de comportamentos como a transferência social de preferência alimentar, déficits na vocalização e aumento de comportamentos repetitivos, demonstrado através do teste das bolas de gude, em que os animais passavam a enterrar um número maior de esferas (Mcfarlane *et al.*, 2008).

No presente estudo, os animais expostos no período pré-natal ao VPA mostraram uma redução no número de bolas de gude enterradas no primeiro intervalo de 10 minutos, e um número significativamente menor de bolas nos intervalos de 20 e 30 minutos quando

comparados aos controles. Houve, uma tendência a reversão deste comportamento após o tratamento com a SVT. Demonstrando, aparentemente, um resultado paradoxal para o modelo.

Dados similares aos apresentados neste estudo já foram observados anteriormente. No teste das bolas de gude foram observadas uma redução no número de esferas enterradas em animais igualmente expostos no período pré-natal ao VPA (Hill *et al.*, 2015) e também em linhagens de ratos desenvolvidos como modelos para o estudo do autismo como ratos *knockout* para o gene *shank1* (Sungur *et al.*, 2014), *knockout* para o gene *ephrin-A* (Wurzman *et al.*, 2015) e linhagens de camundongos C58/J (Ryan *et al.*, 2010). Dados como estes demonstram que pode ser controverso se caracterizar o ato de enterrar esferas de vidro como única manifestação de estereotípias ou movimentos repetitivos. De acordo com Sungur *et al.* (2014) outros movimentos repetitivos como a autolimpeza (*self-grooming*) podem ter sido exacerbados reduzindo o número de bolas de gude enterradas.

Foi demonstrado ainda que nos animais tratados com a SVT houve uma tendência a um aumento no número de bolas de gude enterradas, retornando-se a valores mais próximos aos dos animais-controle. Como já relatado no estudo, talvez o número de bolas enterradas fosse ainda maior caso as estatinas não tivessem como um dos seus principais efeitos adversos sintomas de comprometimento muscular como já discutido anteriormente.

Resta agora trazer à tona a seguinte questão: se clinicamente foi visto que em pacientes com TEA, os níveis de colesterol plasmáticos são, em geral, mais baixos, qual o sentido de se utilizar uma medicação hipolipemiante para o seu tratamento? Para responder a esta pergunta, precisa-se mais uma vez voltar o olhar as condições clínicas já bem caracterizadas que correlacionam o metabolismo do colesterol com o autismo, como a SLO.

Na SLO, considerado o protótipo das doenças que afetam a biossíntese do colesterol, os pacientes exibem níveis extremamente baixos de colesterol plasmático, secundárias a um defeito no gene *DHCR7*, que codifica a enzima 7-Deidrocolesterol redutase, uma das enzimas localizadas na via final da síntese do colesterol (figura 25) (Saher *et al.*, 2011).

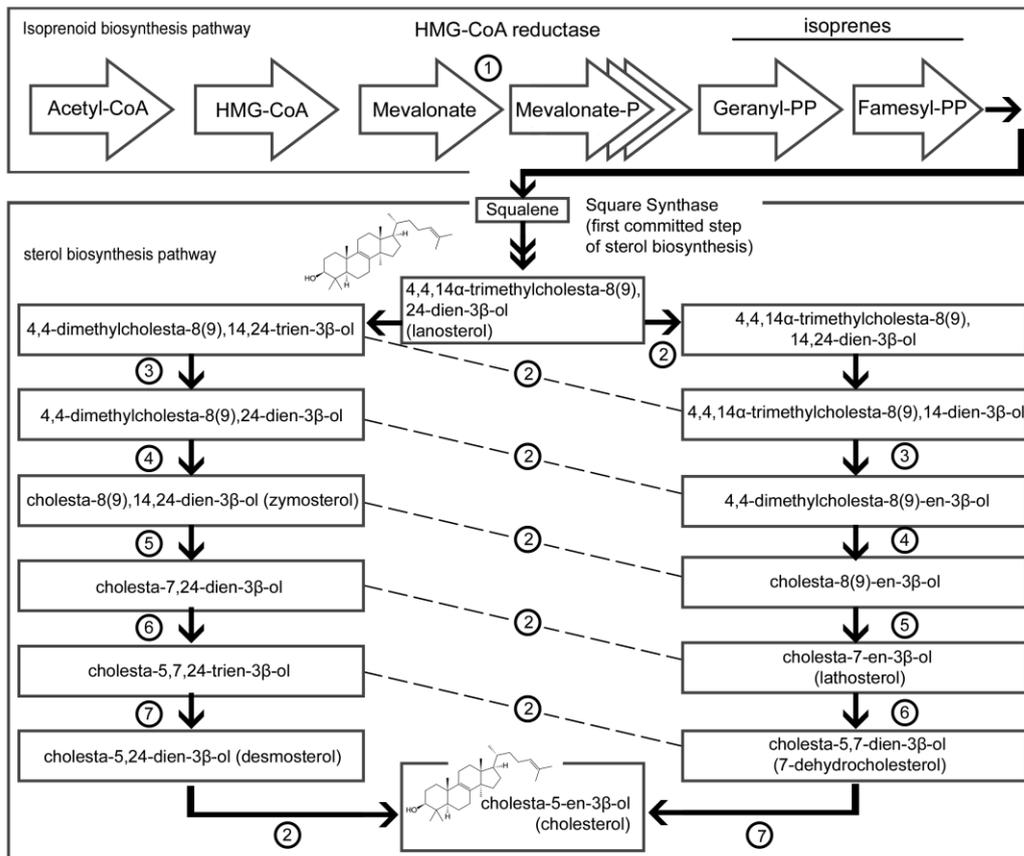


Figura 25: Desenho esquemático da via metabólica de biossíntese do colesterol. A via metabólica de síntese do colesterol inicia-se na via de biossíntese de isoprenóides, que resulta em diversos compostos biologicamente ativos (isoprenóides) envolvidos em diferentes processos celulares. Cada um dos números indicam uma enzima cuja deficiência pode resultar em doenças neurogenéticas que apresentaremos entre parênteses: 1) mevalonato kinase (acidúria mevalônica); 2) 24-dehidrocolesterol redutase (dermosterolose); 3) esterol-C14 redutase (displasia esquelética de Greenberg); 4) 3 β -hidroxiesterol desidrogenase (síndrome CHILD – hemidisplasia congênita, eritrodermia ictiosiforme e defeitos em membros); 5) delta-8, delta-7 esterol isomerase (síndrome de Conradi-Hünemann-Happle); 6) esterol C5 dessaturase (latosterolose) e; 7) 7-dehidrocolesterol redutase (síndrome de Smith-Lemli-Opitz SLO).

Na síndrome de SLO a deficiência na enzima 7-Dehidrocolesterol redutase leva ao acúmulo de 7-dehidrocolesterol (7DHC) com diversos efeitos tóxicos. Além disso, o 7DHC passa a substituir o colesterol na formação das membranas plasmáticas, na formação da bainha de mielina e na formação das vesículas sinápticas importantes no processo de neurotransmissão (Keller *et al.*, 2004). Duas estratégias possíveis de tratamento tem sido empregadas na SLO, a primeira delas através da suplementação dietética de colesterol, que, através de um mecanismo de *biofeedback*, reduziria a síntese de colesterol e conseqüentemente a formação do 7DHC (Platt *et al.*, 2014). Infelizmente, o colesterol dietético é incapaz de ultrapassar a BHE tendo pouco efeito nos sintomas cognitivos associados a SLO.

A administração de estatinas passaria, então, a ser uma forma promissora de tratamento, uma vez que, inibindo a HMGCoA redutase, também levariam a redução na síntese de intermediários tóxicos ao SNC aliado ao fato de ultrapassarem a BHE podendo exercer seus efeitos diretamente no SNC (Wassif *et al.*, 2005).

Outro possível mecanismo de ação das estatinas no SNC derivam de estudos em pacientes com doenças neurodegenerativas como a doença de Alzheimer ou doença de Parkinson onde medicamentos como a ATV exerceriam efeitos neuroprotetores, auxiliando na preservação da função cognitiva e motora dos pacientes através de seus efeitos antioxidantes (Fracassi *et al.*, 2019).

5.5.1 Efeito das estatinas e seu possível papel no tratamento do TEA

Além da questão comportamental, a fisiopatologia do TEA também pode ser investigada do ponto de vista bioquímico. Define-se o estresse oxidativo (EO) como um estado patológico que surge a partir do desequilíbrio entre a produção de EROs e a capacidade de detoxificação da célula resultando em dano as macromoléculas (proteínas, lipídeos e DNA) e interrupção de diversas vias de sinalização (Meguid *et al.*, 2017).

Antioxidantes endógenos, dietéticos ou farmacológicos combatem o EO controlando os níveis de EROs produzidas, removendo seu excesso e reparando as biomoléculas danificadas pelo processo oxidativo (Uttara *et al.*, 2009). Dessa forma, níveis elevados de EO podem estar implicados em muitos transtornos neuropsiquiátricos como a doença de Parkinson, Alzheimer, doença de Huntington, esclerose múltipla e talvez, também estar relacionado ao TEA (Patel e Chu, 2011).

Crianças com TEA são consideradas mais vulneráveis ao EO pelo fato de apresentarem níveis plasmáticos menores de glutathione (Rose *et al.*, 2017), a resposta ao EO é considerada uma pedra angular no processo de neuroinflamação, confirmada como uma das principais implicações fisiopatológicas do autismo (Mcdougale e Carlezon, 2013) e, evidências sugerem ainda que exista uma relação entre os níveis elevados de EO encontrados indivíduos diagnosticados com TEA e exposição a poluentes ambientais como metais pesados (Mostafa *et al.*, 2016).

No protocolo adotado no presente estudo, os sintomas de TEA foram induzidos a partir da exposição pré-natal ao VPA, que conforme discutido no início dessa seção, é o modelo animal de indução do autismo mais estudado e reproduzido até o momento.

De acordo com Tung *et al.* (2011) avaliando células embrionárias de ratos em meio de cultura, verificaram que a exposição ao VPA resultou em aumento nos níveis de EROs, especialmente a nível neuronal, e que o mesmo esteve relacionado a um aumento nos marcadores de apoptose celular. Xenobióticos (compostos químicos estranhos ao organismo) como o VPA podem ser bioativados por enzimas (ex. prostaglandina H sintetase ou lipooxigenase) cujas concentrações encontram-se elevadas no período de vida embrionário e convertidas em intermediários reativos que iniciam a geração de EROs. Caso os níveis de EROs excedam a capacidade de defesa do organismo, o estresse oxidativo resulta em defeitos no desenvolvimento embrionário (Wells *et al.*, 2010). Em resumo, os efeitos neuroteratogênicos do VPA são um resultado da combinação de defesas antioxidantes ainda imaturas com a habilidade do VPA em iniciar a geração de EROs.

Neste estudo, verificou-se que a exposição pré-natal ao VPA resultou em animais com sintomas clinicamente similares ao do TEA além de apresentarem, bioquimicamente, níveis significativamente mais elevados de marcadores de estresse oxidativo e reduzidos de marcadores de defesa antioxidante em diferentes regiões cerebrais. Interessantemente, estes efeitos foram, em parte, revertidos após o tratamento com estatinas na forma de ATV e SVT.

Foi relatado anteriormente que as estatinas estavam sendo estudadas no tratamento de formas muito específicas TEA, aquelas cujos sintomas de autismo estariam relacionados a doenças genéticas raras como a síndrome de SLO, ou a síndrome de Rett, entretanto, e se as estatinas exercessem efeitos fisiopatológicos mais amplos que pudessem ser explorados para o tratamento do TEA em geral?

Sabidamente, elevações nos níveis de colesterol plasmático circulantes aumentam significativamente o risco de aterosclerose assim como o de suas manifestações clínicas como o infarto agudo do miocárdio, acidente vascular isquêmico e doença arterial periférica (Michos *et al.*, 2019). As estatinas, devido ao seu potencial farmacológico de inibição da síntese do colesterol, por inibição da HMG-CoA redutase, têm sido consideradas as medicações mais comumente prescrita para o tratamento da hipercolesterolemia e para o manejo do risco cardiovascular, aliando eficácia e segurança clínica (Cai *et al.*, 2021). Entretanto, embora sua principal ação seja mediada através da redução da concentração de frações específicas do colesterol, particularmente a LDL, os efeitos protetores das estatinas envolvem outros

mecanismos, denominados mecanismos pleiotrópicos, mediados por suas ações antioxidantes (John *et al.*, 2005; Ray e Cannon, 2005).

A exemplo de seus efeitos antioxidantes, as estatinas inibem enzimas pró-oxidantes como a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase, redução da síntese de compostos altamente reativos, aumento da expressão e atividade da oxido nítrico sintase endotelial e suprarregulação de enzimas antioxidantes (Zinellu e Mangoni, 2021).

Tais efeitos antioxidantes das estatinas tem sido explorados, também, no âmbito das doenças neurodegenerativas. A doença de Parkinson é a segunda doença neurodegenerativa mais comum após a doença de Alzheimer e caracteriza-se por tremores, bradicinesia, rigidez e instabilidade postural (Obeso *et al.*, 2010). A característica fisiopatológica da doença de Parkinson é a perda de neurônios dopaminérgicos na substância nigra associada a presença de inclusões proteicas insolúveis denominadas corpos de Lewy (Jankovic e Tan, 2020). Embora a sua etiologia ainda não seja plenamente conhecida, evidências substanciais tem apoiado a hipótese de que o EO é um dos fatores críticos que desencadeiam a doença de Parkinson, uma vez que, em modelos animais dessa doença, foram encontrados elevados níveis de EROs em tecidos cerebrais, intensa ativação de NADPH oxidase e comprometimento das defesas antioxidantes com redução dos níveis de GSH-Px e SOD (Puspita *et al.*, 2017).

Em 2018, Tong, *et al.* investigaram os efeitos neuroprotetores das estatinas em células tratadas com 6-hidroxi-dopamina (modelo comumente utilizado para a geração de modelos experimentais de doença de Parkinson ao induzir apoptose de células dopaminérgicas), verificando que após o tratamento com SVT houve redução dos níveis intracelulares de EROs e aumento da expressão de SOD.

Neste estudo, procurou-se avaliar os efeitos antioxidantes de duas diferentes formas farmacológicas de estatinas em duas regiões cerebrais, córtex e cerebelo. Além do córtex cerebral, o córtex frontal e o cerebelo são duas regiões cerebrais promissoras no estudo da fisiopatologia do TEA.

O córtex cerebral é responsável pelo controle de todas as funções executivas cerebrais, incluindo processamentos cognitivos mais complexos como tomada de decisões, memória de trabalho, emoções, comportamento social, aprendizagem e comunicação, funções essas de grande interesse no estudo do TEA (Donovan e Basson, 2016). As principais observações relacionando alterações cerebrais ao autismo incluem anormalidades na espessura cortical, desorganização neuronal ao longo das camadas corticais e diferenças nas conexões entre as diferentes regiões cerebrais (Courchesne *et al.*, 2011).

Os corpos dos neurônios são “empilhados” uns em cima dos outros em uma organização colunar denominada “minicolunas”, representando, cada uma delas, módulos anatomicamente definidos de unidades de processamento de informações. Essa organização cortical em minicolunas permite que um maior número de neurônios seja conectado por um menor número de axônios, aumentando a conectividade neuronal, especialmente importante na execução de tarefas complexas como as exigidas pelas funções executivas. No TEA, a organização minicolunar no córtex é mais larga durante os primeiros anos de desenvolvimento, alterando toda a trajetória do crescimento cerebral (Buxhoeveden *et al.*, 2006).

O cerebelo é uma estrutura densa, organizada em folias e localizada inferiormente ao córtex occipital. Convencionalmente associada a funções motoras e sabidamente responsável pela propriocepção e controle motor fino, o cerebelo tem sido relacionado, também, a funções cognitivas superiores como a linguagem, processamento cognitivo e regulação do afeto (Becker e Stoodley, 2013). Em 1988, a hipoplasia do vérmis cerebelar foi uma das primeiras alterações neuroanatômicas a serem descritas em cérebros de pessoas com autismo (Courchesne *et al.*, 1988). Desde então, verificou-se que a alteração cerebelar mais consistente no TEA é uma redução substancial no número e no tamanho das células de Purkinje nos hemisférios cerebelares (Fatemi *et al.*, 2012).

Estudos de inativação genética, especificamente nas células de Purkinje, em modelos animais de esclerose tuberosa levaram ao surgimento de sintomas semelhantes ao TEA (Tsai *et al.*, 2012). Sugere-se que áreas específicas do cerebelo exerçam influência em áreas neocorticais remotas relacionadas a interação social existindo uma rede de estruturas cerebrais envolvidas na percepção, integração e decodificação de pistas sociais (D'mello *et al.*, 2015).

Neste estudo, verificou-se que em animais tratados com ATV, os níveis de sulfidrilas em cerebelo e TBA-RS em tecido cerebral se mostraram significativamente reduzidos quando comparados aos animais expostos ao VPA no período pré-natal.

Os grupos tióis, representados pelo radical sulfidrilas (-SH), podem estar ligados a proteínas ou a compostos de baixo peso molecular e, quando o estresse redox está elevado, podem ser oxidados. Dessa forma, sugere-se que espécies reativas reagem com ligações dissulfureto (SS) em proteínas, sendo teor de proteína sulfidrilas um índice de oxidação de proteínas (Stadtman e Levine, 2003). Analisando os dados do presente projeto, os animais tratados com ATV exibiram uma redução significativa nos níveis de sulfidrilas em região cerebelar quando em comparação aos animais expostos ao modelo indutor de TEA.

Uma outra técnica de se avaliar o estresse oxidativo baseia-se no fato de que alguns produtos de peroxidação lipídica reagem ao ácido tiobarbitúrico, dessa forma, quando esse ácido é adicionado ao material biológico, é possível se detectar a presença de TBA-RS. Das substâncias que exibem essa reatividade, o malondialdeído (MDA) é a principal delas, sendo um dos produtos finais do processo de oxidação e decomposição de ácidos graxos polinsaturados. Sua detecção tecidual, então, é um forte indicativo da ocorrência de estresse oxidativo (Little e Gladen, 1999). No presente estudo, os animais tratados com ATV exibiram níveis significativamente mais baixos de TBA-RS em córtex cerebral quando comparados aos animais expostos ao VPA no ambiente uterino.

Similarmente, Catalão *et al.* (2017) já haviam demonstrado níveis reduzidos de TBA-RS em córtex frontal e hipocampo de ratos tratados submetidos a um modelo de sepse e posteriormente tratados com estatinas. Além disso, Koladiya *et al.* (2008) também demonstraram níveis reduzidos de TBA-RS em ratos expostos a um modelo de demência vascular induzida por L-metionina e posteriormente tratados com atorvastavina e pravastatina. Até onde vai nosso conhecimento, não existem estudos que avaliem os efeitos antioxidantes de diferentes formas de estatinas no tecido cerebral em modelos animais de autismo.

Demonstramos assim, em um modelo animal de autismo que a exposição pré-natal ao VPA promovia alterações em parâmetros de estresse oxidativo e que essas alterações eram significativamente revertidas pelo tratamento com duas variedades de estatinas (ATV e SVT) em regiões cerebrais criticamente envolvidas no TEA.

O presente subprojeto apresentou limitações. Seria importante avaliar os níveis de colesterol e de seus intermediários nos tecidos cerebrais. Além disso, outros parâmetros de estresse oxidativo como catalase, glutathione reduzida e glutathione peroxidase poderiam ter seus níveis avaliados, bem como diferentes tecidos cerebrais. Tais falhas refletiram as limitações técnicas existentes em um laboratório de estudo do autismo ainda em fase de estruturação e que devem ser superadas em projetos futuros.

5.6. REFLEXÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

Até o momento, não existe um tratamento farmacológico eficaz para o TEA, muito em parte devido ao fato de que seus aspectos etiológicos ainda são pouco compreendidos. Ainda assim, e apesar de todas as limitações, modelos animais aumentam nossa compreensão tanto da fisiopatologia do autismo como permite o estudo de novos e potenciais tratamentos.

Neste estudo, mostrou-se a ampliação terapêutica potencial das estatinas, inicialmente prescritas para o tratamento da hipercolesterolemia, para o tratamento dos sintomas de TEA. Verificou-se que a sua utilização foi capaz de reverter parâmetros de estresse oxidativo em células cerebrais em modelos animais de autismo refletindo, ainda em melhora comportamental. Oferecendo-se assim, novas possibilidades para estudos terapêuticos futuros.

6 CONCLUSÕES FINAIS

Chegamos ao final deste trabalho com algumas respostas. Quando nos perguntamos se um dia chegaremos a um tratamento farmacológico para o TEA, devemos nos perguntar, para qual tipo de TEA? Se causado pela exposição pré-natal a fármacos prejudiciais ao neurodesenvolvimento, é possível que modelos animais apontem uma direção. Assim, para cada um dos diferentes tipos de “autismos” estudos específicos devem ser desenhados e executados.

Quando nos perguntamos se todos as pessoas dentro do espectro do autismo necessitam destes tratamentos que a ciência tanto busca, é provável que a resposta seja não. O Autismo é um espectro, existindo, como vimos pessoas dentro dele que não apresentam nenhum comprometimento em suas capacidades funcionais.

Finalmente, quando nos perguntamos o que é o autismo. No fim das contas vemos que ele não é propriamente uma doença, talvez uma síndrome. Em medicina, esse termo representa um conjunto de sinais e sintomas com diferentes causas, manifestando-se de formas muito diversas e com prognóstico bastante distintos. E, para tanto, só pode ser estudado considerando-se toda a sua heterogeneidade.

7 REFERÊNCIAS

Abdulmir, H. A.; Abdul-Rasheed, O. F.; Abdulghani, E. A. Serotonin and serotonin transporter levels in autistic children. *Saudi Med J*, 39, n. 5, p. 487-494, 2018.

Aksenov, M. Y.; Markesbery, W. R. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*, 302, n. 2-3, p. 141-145, Apr 20 2001.

Aljunied, M.; Frederickson, N. Does central coherence relate to the cognitive performance of children with autism in dynamic assessments? *Autism*, 17, n. 2, p. 172-183, Mar 2013.

Allain, C. C.; Poon, L. S.; Chan, C. S.; Richmond, W. *et al.* Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin Chem*, 20, n. 4, p. 470-475, Apr 1974.

American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders: DSM-IV-TR. 4th ed. Washington, DC: American Psychiatric Association, 2000.

American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders (5th edition) [DSM-5]. 5th ed. Alington, VA: American Psychiatric Publishing, 2013.

Amir, R. E.; Van Den Veyver, I. B.; Wan, M.; Tran, C. Q. *et al.* Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2. *Nat Genet*, 23, n. 2, p. 185-188, Oct 1999.

Anckarsater, H. Beyond categorical diagnostics in psychiatry: Scientific and medicolegal implications. *Int J Law Psychiatry*, 33, n. 2, p. 59-65, Mar-Apr 2010.

Aneja, A.; Tierney, E. Autism: the role of cholesterol in treatment. *Int Rev Psychiatry*, 20, n. 2, p. 165-170, Apr 2008.

Arnett, J. J. The neglected 95%: why American psychology needs to become less American. *Am Psychol*, 63, n. 7, p. 602-614, Oct 2008.

Asperger, H. Die Autistische Psychopathen im Kindesalter. *Arch. Psych. Nervenkrankh*, 117, p. 76-136, 1944.

Bannister, J. V.; Calabrese, L. Assays for superoxide dismutase. *Methods Biochem Anal*, 32, p. 279-312, 1987.

Barahona-Correa, J. B.; Filipe, C. N. A Concise History of Asperger Syndrome: The Short Reign of a Troublesome Diagnosis. *Front Psychol*, 6, p. 2024, 2015.

Barnard-Brak, L.; Sulak, T.; Hatz, J. K. Macrocephaly in children with autism spectrum disorders. *Pediatr Neurol*, 44, n. 2, p. 97-100, Feb 2011.

Baron-Cohen, S. The hyper-systemizing, assortative mating theory of autism. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 30, n. 5, p. 865-872, Jul 2006.

Baron-Cohen, S. Autism, hypersystemizing, and truth. *Q J Exp Psychol (Hove)*, 61, n. 1, p. 64-75, Jan 2008.

Baron-Cohen, S.; Hammer, J. Parents of Children with Asperger Syndrome: What is the Cognitive Phenotype? *J Cogn Neurosci*, 9, n. 4, p. 548-554, Jul 1997.

Baron-Cohen, S.; Wheelwright, S.; Skinner, R.; Martin, J. *et al.* The autism-spectrum quotient (AQ): evidence from Asperger syndrome/high-functioning autism, males and females, scientists and mathematicians. *J Autism Dev Disord*, 31, n. 1, p. 5-17, Feb 2001.

Barros, S. C. D. V.; Mourão, L. Panorama da participação feminina na educação superior, no mercado de trabalho e na sociedade. *Psicologia & Sociedade*, 30, p. e174090, 2018.

Bartak, L.; Rutter, M. Special educational treatment of autistic children: a comparative study. 1. Design of study and characteristics of units. *J Child Psychol Psychiatry*, 14, n. 3, p. 161-179, Sep 1973.

Baxter, A. J.; Brugha, T. S.; Erskine, H. E.; Scheurer, R. W. *et al.* The epidemiology and global burden of autism spectrum disorders. *Psychol Med*, 45, n. 3, p. 601-613, Feb 2015.

Beck, R. G. Estimativa do número de casos de Transtorno do Espectro Autista no Sul do Brasil. Orientador: ISER, B. M. 2017. 68 f. (Master) - Departamento de Ciências da Saúde, Universidade do Sul de Santa Catarina, Tubarão, Santa Catarina.

Becker, E. B.; Stoodley, C. J. Autism spectrum disorder and the cerebellum. *Int Rev Neurobiol*, 113, p. 1-34, 2013.

Benachenhou, S.; Etcheverry, A.; Galarneau, L.; Dube, J. *et al.* Implication of hypocholesterolemia in autism spectrum disorder and its associated comorbidities: A retrospective case-control study. *Autism Res*, 12, n. 12, p. 1860-1869, Dec 2019.

Benvenuto, A.; Moavero, R.; Alessandrelli, R.; Manzi, B. *et al.* Syndromic autism: causes and pathogenetic pathways. *World J Pediatr*, 5, n. 3, p. 169-176, Aug 2009.

Berry-Kravis, E.; Levin, R.; Shah, H.; Mathur, S. *et al.* Cholesterol levels in fragile X syndrome. *Am J Med Genet A*, 167A, n. 2, p. 379-384, Feb 2015.

Berument, S. K.; Rutter, M.; Lord, C.; Pickles, A. *et al.* Autism screening questionnaire: diagnostic validity. *Br J Psychiatry*, 175, p. 444-451, Nov 1999.

Bettelheim, B. *The Empty Fortress: Infantile Autism and the Birth of the Self*. 1 ed. New York: The Free Press: a division of Simon & Schuster Inc, 1972. 496 p. 978-0029031407.

Bleuer, E. Autistic thinking. *American Journal of Insanity*, 69, n. 5, p. 873-886, 1912.

Bonilha, L. R.; Rivoredo, C. R. [Well-child care: two distinct views]. *J Pediatr (Rio J)*, 81, n. 1, p. 7-13, Jan-Feb 2005.

Bonnell, A.; Mottron, L.; Peretz, I.; Trudel, M. *et al.* Enhanced pitch sensitivity in individuals with autism: a signal detection analysis. *J Cogn Neurosci*, 15, n. 2, p. 226-235, Feb 15 2003.

Broekkamp, C. L.; Rijk, H. W.; Joly-Gelouin, D.; Lloyd, K. L. Major tranquillizers can be distinguished from minor tranquillizers on the basis of effects on marble burying and swim-induced grooming in mice. *Eur J Pharmacol*, 126, n. 3, p. 223-229, Jul 31 1986.

Bronzuoli, M. R.; Facchinetti, R.; Ingrassia, D.; Sarvadio, M. *et al.* Neuroglia in the autistic brain: evidence from a preclinical model. *Mol Autism*, 9, p. 66, 2018.

Buxhoeveden, D. P.; Semendeferi, K.; Buckwalter, J.; Schenker, N. *et al.* Reduced minicolumns in the frontal cortex of patients with autism. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 32, n. 5, p. 483-491, Oct 2006.

Cai, T.; Abel, L.; Langford, O.; Monaghan, G. *et al.* Associations between statins and adverse events in primary prevention of cardiovascular disease: systematic review with pairwise, network, and dose-response meta-analyses. *BMJ*, 374, p. n1537, Jul 14 2021.

Capkova, Z.; Capkova, P.; Srovnal, J.; Staffova, K. *et al.* Differences in the importance of microcephaly, dysmorphism, and epilepsy in the detection of pathogenic CNVs in ID and ASD patients. *PeerJ*, 7, p. e7979, 2019.

Catalao, C. H. R.; Santos-Junior, N. N.; Da Costa, L. H. A.; Souza, A. O. *et al.* Brain Oxidative Stress During Experimental Sepsis Is Attenuated by Simvastatin Administration. *Mol Neurobiol*, 54, n. 9, p. 7008-7018, Nov 2017.

Cheeseman, K. Determinação de produtos de peroxidação lipídica aldeídicos: malonaldeído e 4-hidroxinonal. *Métodos enzimol.*, 186, p. 406-413, 1990.

Clarke, D. F.; Roberts, W.; Daraksan, M.; Dupuis, A. *et al.* The prevalence of autistic spectrum disorder in children surveyed in a tertiary care epilepsy clinic. *Epilepsia*, 46, n. 12, p. 1970-1977, Dec 2005.

Cohen, D.; Pichard, N.; Tordjman, S.; Baumann, C. *et al.* Specific genetic disorders and autism: clinical contribution towards their identification. *J Autism Dev Disord*, 35, n. 1, p. 103-116, Feb 2005.

Constantino, J. N.; Todd, R. D. Autistic traits in the general population: a twin study. *Arch Gen Psychiatry*, 60, n. 5, p. 524-530, May 2003.

Cop, E.; Yurtbasi, P.; Oner, O.; Munir, K. M. Genetic testing in children with autism spectrum disorders. *Anadolu Psikiyatri Derg*, 16, n. 6, p. 426-432, 2015.

Courchesne, E.; Campbell, K.; Solso, S. Brain growth across the life span in autism: age-specific changes in anatomical pathology. *Brain Res*, 1380, p. 138-145, Mar 22 2011.

Courchesne, E.; Yeung-Courchesne, R.; Press, G. A.; Hesselink, J. R. *et al.* Hypoplasia of cerebellar vermal lobules VI and VII in autism. *N Engl J Med*, 318, n. 21, p. 1349-1354, May 26 1988.

Crawford, D. C.; Acuna, J. M.; Sherman, S. L. FMR1 and the fragile X syndrome: human genome epidemiology review. *Genet Med*, 3, n. 5, p. 359-371, Sep-Oct 2001.

D'mello, A. M.; Crocetti, D.; Mostofsky, S. H.; Stoodley, C. J. Cerebellar gray matter and lobular volumes correlate with core autism symptoms. *Neuroimage Clin*, 7, p. 631-639, 2015.

Davidovitch, M.; Levit-Binnun, N.; Golan, D.; Manning-Courtney, P. Late diagnosis of autism spectrum disorder after initial negative assessment by a multidisciplinary team. *J Dev Behav Pediatr*, 36, n. 4, p. 227-234, May 2015.

Dawson, M.; Gernsbacher, M. A. Effectiveness of intensive autism programmes. *Lancet*, 375, n. 9716, p. 722-723; author reply 723, Feb 27 2010.

De Oliveira, R. R.; Melo, E. C.; Novaes, E. S.; Ferracioli, P. L. R. V. *et al.* Fatores associados ao parto cesárea nos sistemas público e privado de atenção à saúde. *Rev Esc Enferm USP*, 50, n. 5, p. 734-741, 2016.

De Theije, C. G.; Wu, J.; Da Silva, S. L.; Kamphuis, P. J. *et al.* Pathways underlying the gut-to-brain connection in autism spectrum disorders as future targets for disease management. *Eur J Pharmacol*, 668 Suppl 1, p. S70-80, Sep 2011.

Diallo, F. B.; Fombonne, E.; Kisely, S.; Rochette, L. *et al.* Prevalence and Correlates of Autism Spectrum Disorders in Quebec: Prevalence et correlats des troubles du spectre de l'autisme au Quebec. *Can J Psychiatry*, 63, n. 4, p. 231-239, Apr 2018.

Dietschy, J. M. Central nervous system: cholesterol turnover, brain development and neurodegeneration. *Biol Chem*, 390, n. 4, p. 287-293, Apr 2009.

Dohn, A.; Garza-Villarreal, E. A.; Heaton, P.; Vuust, P. Do musicians with perfect pitch have more autism traits than musicians without perfect pitch? An empirical study. *PLoS One*, 7, n. 5, p. e37961, 2012.

Donovan, A.; Basson, M. The neuroanatomy of autism – a developmental perspective. *Journal of Anatomy*, 230, 09/01 2016.

Donovan, J.; Zucker, C. Outra sintonia: a história do autismo. Tradução DE ARAÚJO, L. A. Primeira Edição ed. São Paulo : Companhia das Letras, 2016. 664 p. 978-8535929010.

Eaves, R. C.; Milner, B. The criterion-related validity of the Childhood Autism Rating Scale and the Autism Behavior Checklist. *J Abnorm Child Psychol*, 21, n. 5, p. 481-491, Oct 1993.

Eisenberg, L.; Kanner, L. Childhood schizophrenia; symposium, 1955. VI. Early infantile autism, 1943-55. *Am J Orthopsychiatry*, 26, n. 3, p. 556-566, Jul 1956.

Elder, J.; Kreider, C.; Brasher, S.; Ansell, M. Clinical impact of early diagnosis of autism on the prognosis and parent-child relationships. *Psychology Research and Behavior Management*, Volume 10, p. 283-292, 08/01 2017.

Ewen, J. B.; Marvin, A. R.; Law, K.; Lipkin, P. H. Epilepsy and Autism Severity: A Study of 6,975 Children. *Autism Res*, 12, n. 8, p. 1251-1259, Aug 2019.

Fatemi, S. H.; Aldinger, K. A.; Ashwood, P.; Bauman, M. L. *et al.* Consensus paper: pathological role of the cerebellum in autism. *Cerebellum*, 11, n. 3, p. 777-807, Sep 2012.

Fernell, E.; Eriksson, M.; Gillberg, C. Early diagnosis of autism and impact on prognosis: A narrative review. *Clinical epidemiology*, 5, p. 33-43, 02/21 2013.

Ferreira, E. C. V. Prevalência do autismo em Santa Catarina: uma visão epidemiológica contribuindo para a inclusão social. Orientador: KUPEK, E. 2008. 101 f. (Master) - Departamento de Saúde Pública, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina.

Fidler, D.; Bailey, J.; Smalley, S. Macrocephaly in autism and other pervasive developmental disorders. *Developmental medicine and child neurology*, 42, p. 737-740, 12/01 2000.

Finegold, S. M.; Dowd, S. E.; Gontcharova, V.; Liu, C. *et al.* Pyrosequencing study of fecal microflora of autistic and control children. *Anaerobe*, 16, n. 4, p. 444-453, Aug 2010.

Folstein, S.; Rutter, M. Infantile autism: a genetic study of 21 twin pairs. *J Child Psychol Psychiatry*, 18, n. 4, p. 297-321, Sep 1977.

Fombonne, E. Epidemiology of pervasive developmental disorders. *Pediatr Res*, 65, n. 6, p. 591-598, Jun 2009.

Fombonne, E.; Du Mazaubrun, C.; Cans, C.; Grandjean, H. Autism and associated medical disorders in a French epidemiological survey. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, 36, n. 11, p. 1561-1569, Nov 1997.

Fombonne, E.; Roge, B.; Claverie, J.; Courty, S. *et al.* Microcephaly and macrocephaly in autism. *J Autism Dev Disord*, 29, n. 2, p. 113-119, Apr 1999.

Fracassi, A.; Marangoni, M.; Rosso, P.; Pallottini, V. *et al.* Statins and the Brain: More than Lipid Lowering Agents? *Curr Neuropharmacol*, 17, n. 1, p. 59-83, 2019.

Freeman, K. A.; Eagle, R.; Merkens, L. S.; Sikora, D. *et al.* Challenging behavior in Smith-Lemli-Opitz syndrome: initial test of biobehavioral influences. *Cogn Behav Neurol*, 26, n. 1, p. 23-29, Mar 2013.

Fulceri, F.; Morelli, M.; Santocchi, E.; Cena, H. *et al.* Gastrointestinal symptoms and behavioral problems in preschoolers with Autism Spectrum Disorder. *Dig Liver Dis*, 48, n. 3, p. 248-254, Mar 2016.

Gerard, E. E.; Meador, K. J. An Update on Maternal Use of Antiepileptic Medications in Pregnancy and Neurodevelopment Outcomes. *J Pediatr Genet*, 4, n. 2, p. 94-110, Jun 2015.

Gillberg, C. Debate and argument: having Rett syndrome in the ICD-10 PDD category does not make sense. *J Child Psychol Psychiatry*, 35, n. 2, p. 377-378, Feb 1994.

Glowinski, J.; Iversen, L. Regional studies of catecholamines in the rat brain. 3. Subcellular distribution of endogenous and exogenous catecholamines in various brain regions. *Biochem Pharmacol*, 15, n. 7, p. 977-987, Jul 1966.

Goncalves, C. L.; Vasconcelos, F. F. P.; Wessler, L. B.; Lemos, I. S. *et al.* Exposure to a high dose of amoxicillin causes behavioral changes and oxidative stress in young zebrafish. *Metab Brain Dis*, 35, n. 8, p. 1407-1416, Dec 2020.

Governo De Santa Catarina. Conheça Santa Catarina. 2020. Disponível em: <http://www.sc.gov.br/conhecasc>. Acesso em: 11/19/2020.

Graph Prism Versão 5.0. Graph Prism versão 5.0. Versão 5.0. San Diego, CA, USA.: 2012.

Hamad, A. F.; Alessi-Severini, S.; Mahmud, S. M.; Brownell, M. *et al.* Prenatal antibiotics exposure and the risk of autism spectrum disorders: A population-based cohort study. *PLoS One*, 14, n. 8, p. e0221921, 2019.

Happe, F.; Ronald, A.; Plomin, R. Time to give up on a single explanation for autism. *Nat Neurosci*, 9, n. 10, p. 1218-1220, Oct 2006.

Hill, A. P.; Zuckerman, K. E.; Fombonne, E. Obesity and Autism. *Pediatrics*, 136, n. 6, p. 1051-1061, Dec 2015.

Hodges, H.; Fealko, C.; Soares, N. Autism spectrum disorder: definition, epidemiology, causes, and clinical evaluation. *Transl Pediatr*, 9, n. Suppl 1, p. S55-S65, Feb 2020.

Hrabovska, S. V.; Salyha, Y. T. Animal models of autism spectrum disorders and behavioral techniques of their examination. *Neurophysiology*, 48, n. 5, p. 380-388, 2016.

Hultman, C. M.; Sandin, S.; Levine, S. Z.; Lichtenstein, P. *et al.* Advancing paternal age and risk of autism: new evidence from a population-based study and a meta-analysis of epidemiological studies. *Mol Psychiatry*, 16, n. 12, p. 1203-1212, Dec 2011.

Ibm Corporation. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 21.0. Versão 21.0. Armonk, NY: IBM Corp., 2012.

Icasiano, F.; Hewson, P.; Machet, P.; Cooper, C. *et al.* Childhood autism spectrum disorder in the Barwon region: a community based study. *J Paediatr Child Health*, 40, n. 12, p. 696-701, Dec 2004.

Instituto Brasileiro De Geografia E Estatística. Brasil. 2020a. Disponível em: <https://paises.ibge.gov.br/#/mapa/brasil>. Acesso em: Oct 16.

Instituto Brasileiro De Geografia E Estatística. Censo Santa Catarina. 2020b. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/censo>. Acesso em: 11/19/2020.

Irons, M.; Elias, E. R.; Salen, G.; Tint, G. S. *et al.* Defective cholesterol biosynthesis in Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Lancet*, 341, n. 8857, p. 1414, May 29 1993.

Jaarsma, P.; Welin, S. Autism as a natural human variation: reflections on the claims of the neurodiversity movement. *Health Care Anal*, 20, n. 1, p. 20-30, Mar 2012.

Jankovic, J.; Tan, E. K. Parkinson's disease: etiopathogenesis and treatment. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 91, n. 8, p. 795-808, Aug 2020.

John, S.; Schneider, M. P.; Delles, C.; Jacobi, J. *et al.* Lipid-independent effects of statins on endothelial function and bioavailability of nitric oxide in hypercholesterolemic patients. *Am Heart J*, 149, n. 3, p. 473, Mar 2005.

Jones, L. A.; Campbell, J. M. Clinical characteristics associated with language regression for children with autism spectrum disorders. *J Autism Dev Disord*, 40, n. 1, p. 54-62, Jan 2010.

Kalkbrenner, A. E.; Schmidt, R. J.; Penlesky, A. C. Environmental chemical exposures and autism spectrum disorders: a review of the epidemiological evidence. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care*, 44, n. 10, p. 277-318, Nov 2014.

Kalra, V.; Seth, R.; Sapra, S. Autism -- experiences in a tertiary care hospital. *Indian J Pediatr*, 72, n. 3, p. 227-230, Mar 2005.

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

Kanner, L.; Eisenberg, L. Early infantile autism, 1943-1955. *Psychiatr Res Rep Am Psychiatr Assoc*, n. 7, p. 55-65, Apr 1957.

Kapp, S. K.; Gillespie-Lynch, K.; Sherman, L. E.; Hutman, T. Deficit, difference, or both? Autism and neurodiversity. *Dev Psychol*, 49, n. 1, p. 59-71, Jan 2013.

Keller, R. K.; Arnold, T. P.; Fliesler, S. J. Formation of 7-dehydrocholesterol-containing membrane rafts in vitro and in vivo, with relevance to the Smith-Lemli-Opitz syndrome. *J Lipid Res*, 45, n. 2, p. 347-355, Feb 2004.

Kim, E. K.; Neggers, Y. H.; Shin, C. S.; Kim, E. *et al.* Alterations in lipid profile of autistic boys: a case control study. *Nutr Res*, 30, n. 4, p. 255-260, Apr 2010.

Klin, A. Asperger syndrome: an update. *Braz J Psychiatry*, 25, n. 2, p. 103-109, Jun 2003.

Klin, A.; Pauls, D.; Schultz, R.; Volkmar, F. Three diagnostic approaches to Asperger syndrome: implications for research. *J Autism Dev Disord*, 35, n. 2, p. 221-234, Apr 2005.

Koladiya, R. U.; Jaggi, A. S.; Singh, N.; Sharma, B. K. Ameliorative role of Atorvastatin and Pitavastatin in L-Methionine induced vascular dementia in rats. *BMC Pharmacol*, 8, p. 14, Aug 9 2008.

Koren, G.; Nava-Ocampo, A.; Moretti, M.; Sussman, R. *et al.* Major malformations with valproic acid. *Canadian family physician Médecin de famille canadien*, 52, p. 441-442, 444, 447, 05/01 2006.

Kupka, M. S.; Ferraretti, A. P.; De Mouzon, J.; Erb, K. *et al.* Assisted reproductive technology in Europe, 2010: results generated from European registers by ESHREdagger. *Hum Reprod*, 29, n. 10, p. 2099-2113, Oct 10 2014.

Lebel, C. P.; Ali, S. F.; Mckee, M.; Bondy, S. C. Organometal-induced increases in oxygen reactive species: the potential of 2',7'-dichlorofluorescein diacetate as an index of neurotoxic damage. *Toxicol Appl Pharmacol*, 104, n. 1, p. 17-24, Jun 1 1990.

Lewens, T.; Mcmillan, J. Defining disease. *Lancet*, 363, n. 9409, p. 664, Feb 21 2004.

Lin, J.; Souza-Lin, G. R.; Antunes, F. C.; Wessler, L. B. *et al.* Autismo associado à síndrome de deleção do cromossomo 12q24.31-q24.33: relato adicional de um distúrbio extremamente raro. *Einstein (Sao Paulo)*, 18, p. eRC5335, 2020.

Lin, J.; Souza-Lin, G. R.; Fileti, M. E. a. D. M.; Denicol, T. L. *et al.* A importância da investigação genética em casos de transtornos do espectro do autismo: relato de Síndrome de Phelan-Mcdermid. *Revista AMRIGS*, 64, n. 1, p. 96-101, 2020.

Little, R. E.; Gladen, B. C. Levels of lipid peroxides in uncomplicated pregnancy: a review of the literature. *Reprod Toxicol*, 13, n. 5, p. 347-352, Sep-Oct 1999.

Liu, L.; Gao, J.; He, X.; Cai, Y. *et al.* Association between assisted reproductive technology and the risk of autism spectrum disorders in the offspring: a meta-analysis. *Sci Rep*, 7, p. 46207, Apr 7 2017.

Londei, T.; Valentini, A. M.; Leone, V. G. Investigative burying by laboratory mice may involve non-functional, compulsive, behaviour. *Behav Brain Res*, 94, n. 2, p. 249-254, Aug 1998.

Loomes, R.; Hull, L.; Mandy, W. P. L. What Is the Male-to-Female Ratio in Autism Spectrum Disorder? A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, 56, n. 6, p. 466-474, Jun 2017.

Lord, C.; Bishop, S. L. Recent advances in autism research as reflected in DSM-5 criteria for autism spectrum disorder. *Annu Rev Clin Psychol*, 11, p. 53-70, 2015.

Lord, C.; Brugha, T. S.; Charman, T.; Cusack, J. *et al.* Autism spectrum disorder. *Nat Rev Dis Primers*, 6, n. 1, p. 5, Jan 16 2020.

Lord, C.; Elsabbagh, M.; Baird, G.; Veenstra-Vanderweele, J. Autism spectrum disorder. *Lancet*, 392, n. 10146, p. 508-520, Aug 11 2018.

Mabunga, D. F.; Gonzales, E. L.; Kim, J. W.; Kim, K. C. *et al.* Exploring the Validity of Valproic Acid Animal Model of Autism. *Exp Neurobiol*, 24, n. 4, p. 285-300, Dec 2015.

Maenner, M. J.; Shaw, K. A.; Baio, J.; Eds *et al.* Prevalence of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years - Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2016. *MMWR Surveill Summ*, 69, n. 4, p. 1-12, Mar 27 2020.

Maenner, M. J.; Shaw, K. A.; Bakian, A. V.; Bilder, D. A. *et al.* Prevalence and Characteristics of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years - Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2018. *MMWR Surveill Summ*, 70, n. 11, p. 1-16, Dec 3 2021.

Malbouisson, C.; Tiryaki, G. F.; Ferreira, V.; Mendes, V. O ensino público deve ser gratuito? Algumas considerações preliminares. *Radar*, 49, p. 21-25, 2017.

Malterud, K.; Guassora, A. D.; Graungaard, A. H.; Reventlow, S. Understanding medical symptoms: a conceptual review and analysis. *Theor Med Bioeth*, 36, n. 6, p. 411-424, Dec 2015.

Mayes, S. D.; Calhoun, S. L. Non-significance of early speech delay in children with autism and normal intelligence and implications for DSM-IV Asperger's disorder. *Autism*, 5, n. 1, p. 81-94, Mar 2001.

Mcadoo, W. G.; Demyer, M. Personality characteristics. *In: RUTTER, M. e SCHOPLER, E. (Ed.). Autism: A Reappraisal of Concepts and Treatment. 1 ed. New York: Plenum, 1978. v. 1, p. 251-268.*

Mcdougale, C. J.; Carlezon, W. A., Jr. Neuroinflammation and autism: toward mechanisms and treatments. *Neuropsychopharmacology*, 38, n. 1, p. 241-242, Jan 2013.

Mcfarlane, H. G.; Kusek, G. K.; Yang, M.; Phoenix, J. L. *et al.* Autism-like behavioral phenotypes in BTBR T+tf/J mice. *Genes Brain Behav*, 7, n. 2, p. 152-163, Mar 2008.

Meguid, N.; Dawood, R.; Bader El Din, N.; Ghozlan, S. *et al.* Expression of Reactive Oxygen Species-Related Transcripts in Egyptian Children With Autism. *Biomarker Insights*, 12, 02/01 2017.

Mesibov, G. B.; Adams, L. A.; Schopler, E. Autism: A Brief History. *Psychoanalytic Inquiry: A Topical Journal for Mental Health Professionals*, 20, n. 5, p. 637-647, 2000.

Michos, E. D.; Mcevoy, J. W.; Blumenthal, R. S. Lipid Management for the Prevention of Atherosclerotic Cardiovascular Disease. *N Engl J Med*, 381, n. 16, p. 1557-1567, Oct 17 2019.

Ming, X.; O'Connor, M.; Bandart, S.; He, W. *et al.* The utility of MRI in children with autism spectrum disorder. *Autism Open Access*, 6, n. 1, p. e1000164, 2016.

Ministério Da Educação. Áreas de Conhecimento / Campos do Saber. 2020. Disponível em: <http://portal.mec.gov.br/secretaria-de-regulacao-e-supervisao-da-educacao-superiores/323-secretarias-112877938/orgaos-vinculados-82187207/12798-areas-de-conhecimento-campos-de-saber>. Acesso em: October 29.

Ministério Da Saúde. Nascidos vivos: Brasil. 2020. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinasc/cnv/nvuf.def>. Acesso em: 11/11/2020.

Mostafa, G. A.; Bjorklund, G.; Urbina, M. A.; Al-Ayadhi, L. Y. The levels of blood mercury and inflammatory-related neuropeptides in the serum are correlated in children with autism spectrum disorder. *Metab Brain Dis*, 31, n. 3, p. 593-599, Jun 2016.

Muller, C. L.; Anacker, A. M. J.; Veenstra-Vanderweele, J. The serotonin system in autism spectrum disorder: From biomarker to animal models. *Neuroscience*, 321, p. 24-41, May 3 2016.

Najman, J. M.; Williams, G. M.; Nikles, J.; Spence, S. *et al.* Bias influencing maternal reports of child behaviour and emotional state. *Soc Psychiatry Psychiatr Epidemiol*, 36, n. 4, p. 186-194, Apr 2001.

Neul, J. L.; Lane, J. B.; Lee, H. S.; Geerts, S. *et al.* Developmental delay in Rett syndrome: data from the natural history study. *J Neurodev Disord*, 6, n. 1, p. 20, 2014.

Njung'e, K.; Handley, S. L. Evaluation of marble-burying behavior as a model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav*, 38, n. 1, p. 63-67, Jan 1991.

Obeso, J. A.; Rodriguez-Oroz, M. C.; Goetz, C. G.; Marin, C. *et al.* Missing pieces in the Parkinson's disease puzzle. *Nat Med*, 16, n. 6, p. 653-661, Jun 2010.

Orth, M.; Bellosta, S. Cholesterol: its regulation and role in central nervous system disorders. *Cholesterol*, 2012, p. 292598, 2012.

Parmeggiani, A.; Posar, A.; Giovanardi-Rossi, P.; Andermann, F. *et al.* Autism, macrocrania and epilepsy: How are they linked? *Brain & development*, 24, p. 296-299, 09/01 2002.

Patel, V. P.; Chu, C. T. Nuclear transport, oxidative stress, and neurodegeneration. *Int J Clin Exp Pathol*, 4, n. 3, p. 215-229, Mar 2011.

Paula, C. S.; Fombonne, E.; Gadia, C.; Tuchman, R. *et al.* Autism in Brazil - perspectives from science and society. *Rev Assoc Med Bras*, 57, n. 1, p. 2-5, 2011.

Paula, C. S.; Ribeiro, S. H.; Fombonne, E.; Mercadante, M. T. Brief report: prevalence of pervasive developmental disorder in Brazil: a pilot study. *J Autism Dev Disord*, 41, n. 12, p. 1738-1742, Dec 2011.

Pedro-Botet, J.; Millan Nunez-Cortes, J.; Chillaron, J. J.; Flores-Le Roux, J. A. *et al.* Severity of statin-induced adverse effects on muscle and associated conditions: data from the DAMA study. *Expert Opin Drug Saf*, 15, n. 12, p. 1583-1587, Dec 2016.

Peklari, E. Mathematical skills in autism spectrum disorder. *Asian Journal of Applied Science and Technology (AJAST)*, 3, n. 1, p. 111-123, 2019.

Pereira, A.; Riesgo, R. S.; Wagner, M. B. Childhood autism: translation and validation of the Childhood Autism Rating Scale for use in Brazil. *J Pediatr (Rio J)*, 84, n. 6, p. 487-494, Nov-Dec 2008.

Pesonen, H.; Waltz, M.; Fabri, M.; Lahdelma, M. *et al.* Students and graduates with autism: perceptions of support when preparing for transition from university to work. *European Journal of Special Needs Education*, 36, p. 1-16, 06/01 2020.

Pfriege, F. W. Cholesterol homeostasis and function in neurons of the central nervous system. *Cell Mol Life Sci*, 60, n. 6, p. 1158-1171, Jun 2003.

Piermartiri, T. C.; Figueiredo, C. P.; Rial, D.; Duarte, F. S. *et al.* Atorvastatin prevents hippocampal cell death, neuroinflammation and oxidative stress following amyloid-beta(1-40)

administration in mice: evidence for dissociation between cognitive deficits and neuronal damage. *Exp Neurol*, 226, n. 2, p. 274-284, Dec 2010.

Piermartiri, T. C.; Vandresen-Filho, S.; De Araujo Herculano, B.; Martins, W. C. *et al.* Atorvastatin prevents hippocampal cell death due to quinolinic acid-induced seizures in mice by increasing Akt phosphorylation and glutamate uptake. *Neurotox Res*, 16, n. 2, p. 106-115, Aug 2009.

Pisula, E.; Kawa, R.; Szostakiewicz, L.; Lucka, I. *et al.* Autistic traits in male and female students and individuals with high functioning autism spectrum disorders measured by the Polish version of the Autism-Spectrum Quotient. *PLoS One*, 8, n. 9, p. e75236, 2013.

Platt, F. M.; Wassif, C.; Colaco, A.; Dardis, A. *et al.* Disorders of cholesterol metabolism and their unanticipated convergent mechanisms of disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 15, p. 173-194, 2014.

Puspita, L.; Chung, S.; Shim, J.-W. Oxidative stress and cellular pathologies in Parkinson's disease. *Molecular Brain*, 10, 12/01 2017.

Ramachandran, R.; Wierzbicki, A. S. Statins, Muscle Disease and Mitochondria. *J Clin Med*, 6, n. 8, Jul 25 2017.

Rasalam, A. D.; Hailey, H.; Williams, J. H.; Moore, S. J. *et al.* Characteristics of fetal anticonvulsant syndrome associated autistic disorder. *Dev Med Child Neurol*, 47, n. 8, p. 551-555, Aug 2005.

Ray, K. K.; Cannon, C. P. Early time to benefit with intensive statin treatment: could it be the pleiotropic effects? *Am J Cardiol*, 96, n. 5A, p. 54F-60F, Sep 5 2005.

Rimland, B. *Infantile autism: The syndrome and its implications for a neural theory of behavior (The Century psychology series)*. New York: Appleton-Century-Crofts, 1964. 282 p.

Rizzoli, P.; Mullally, W. J. Headache. *Am J Med*, 131, n. 1, p. 17-24, Jan 2018.

Robins, D. L.; Fein, D.; Barton, M. L.; Green, J. A. The Modified Checklist for Autism in Toddlers: an initial study investigating the early detection of autism and pervasive developmental disorders. *J Autism Dev Disord*, 31, n. 2, p. 131-144, Apr 2001.

Rose, S.; Bennuri, S. C.; Wynne, R.; Melnyk, S. *et al.* Mitochondrial and redox abnormalities in autism lymphoblastoid cells: a sibling control study. *FASEB J*, 31, n. 3, p. 904-909, Mar 2017.

Ruggeri, B.; Sarkans, U.; Schumann, G.; Persico, A. M. Biomarkers in autism spectrum disorder: the old and the new. *Psychopharmacology (Berl)*, 231, n. 6, p. 1201-1216, Mar 2014.

Rutter, M. Diagnosis and definition of childhood autism. *J Autism Child Schizophr*, 8, n. 2, p. 139-161, Jun 1978.

Rutter, M. L. Progress in understanding autism: 2007-2010. *J Autism Dev Disord*, 41, n. 4, p. 395-404, Apr 2011.

Ryan, B. C.; Young, N. B.; Crawley, J. N.; Bodfish, J. W. *et al.* Social deficits, stereotypy and early emergence of repetitive behavior in the C58/J inbred mouse strain. *Behav Brain Res*, 208, n. 1, p. 178-188, Mar 17 2010.

Saher, G.; Quintes, S.; Nave, K. A. Cholesterol: a novel regulatory role in myelin formation. *Neuroscientist*, 17, n. 1, p. 79-93, Feb 2011.

Samadi, S. A.; Mcconkey, R. Autism in developing countries: lessons from iran. *Autism Res Treat*, 2011, p. 145359, 2011.

Sandin, S.; Nygren, K. G.; Iliadou, A.; Hultman, C. M. *et al.* Autism and mental retardation among offspring born after in vitro fertilization. *JAMA*, 310, n. 1, p. 75-84, Jul 3 2013.

Sandin, S.; Schendel, D.; Magnusson, P.; Hultman, C. *et al.* Autism risk associated with parental age and with increasing difference in age between the parents. *Mol Psychiatry*, 21, n. 5, p. 693-700, May 2016.

Sato, F. P.; Paula, C. S.; Lowenthal, R.; Nakano, E. Y. *et al.* Instrument to screen cases of pervasive developmental disorder: a preliminary indication of validity. *Braz J Psychiatry*, 31, n. 1, p. 30-33, Mar 2009.

Schaefer, G. B. Clinical Genetic Aspects of ASD Spectrum Disorders. *Int J Mol Sci*, 17, n. 2, Jan 29 2016.

Schaefer, G. B.; Mendelsohn, N. J.; Professional, P.; Guidelines, C. Clinical genetics evaluation in identifying the etiology of autism spectrum disorders: 2013 guideline revisions. *Genet Med*, 15, n. 5, p. 399-407, May 2013.

Schlickmann, E.; Fortunato, J. J. O uso de ácido valpróico para a indução de modelos animais de autismo: uma revisão. *J Bras Psiquiatr.*, 2, 62, p. 153-159, 2013.

Schmitt, U.; Hiemke, C. Strain differences in open-field and elevated plus-maze behavior of rats without and with pretest handling. *Pharmacol Biochem Behav*, 59, n. 4, p. 807-811, Apr 1998.

Schneider, T.; Przewlocki, R. Behavioral alterations in rats prenatally exposed to valproic acid: animal model of autism. *Neuropsychopharmacology*, 30, n. 1, p. 80-89, Jan 2005.

Schroeder, J. C.; Deliu, E.; Novarino, G.; Schmeisser, M. J. Genetic and Pharmacological Reversibility of Phenotypes in Mouse Models of Autism Spectrum Disorder. *Adv Anat Embryol Cell Biol*, 224, p. 189-211, 2017.

Segatto, M.; Trapani, L.; Di Tunno, I.; Sticozzi, C. *et al.* Cholesterol metabolism is altered in Rett syndrome: a study on plasma and primary cultured fibroblasts derived from patients. *PLoS One*, 9, n. 8, p. e104834, 2014.

Servadio, M.; Manduca, A.; Melancia, F.; Leboffe, L. *et al.* Impaired repair of DNA damage is associated with autistic-like traits in rats prenatally exposed to valproic acid. *Eur Neuropsychopharmacol*, 28, n. 1, p. 85-96, Jan 2018.

Shallcross, R.; Bromley, R. L.; Irwin, B.; Bonnett, L. J. *et al.* Child development following in utero exposure: levetiracetam vs sodium valproate. *Neurology*, 76, n. 4, p. 383-389, Jan 25 2011.

Sierra, S.; Ramos, M. C.; Molina, P.; Esteo, C. *et al.* Statins as neuroprotectants: a comparative in vitro study of lipophilicity, blood-brain-barrier penetration, lowering of brain cholesterol, and decrease of neuron cell death. *J Alzheimers Dis*, 23, n. 2, p. 307-318, 2011.

Sikora, D. M.; Pettit-Kekel, K.; Penfield, J.; Merkens, L. S. *et al.* The near universal presence of autism spectrum disorders in children with Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Am J Med Genet A*, 140, n. 14, p. 1511-1518, Jul 15 2006.

Silverman, J. L.; Yang, M.; Lord, C.; Crawley, J. N. Behavioural phenotyping assays for mouse models of autism. *Nat Rev Neurosci*, 11, n. 7, p. 490-502, Jul 2010.

Siperstein, R.; Volkmar, F. Brief report: parental reporting of regression in children with pervasive developmental disorders. *J Autism Dev Disord*, 34, n. 6, p. 731-734, Dec 2004.

Smith, D. W.; Lemli, L.; Opitz, J. M. A Newly Recognized Syndrome of Multiple Congenital Anomalies. *J Pediatr*, 64, p. 210-217, Feb 1964.

Spitzer, R. L.; Cantwell, D. P. The DSM-III classification of the psychiatric disorders of infancy, childhood, and adolescence. *J Am Acad Child Psychiatry*, 19, n. 3, p. 356-370, Summer 1980.

Stadtman, E. R.; Levine, R. L. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids*, 25, n. 3-4, p. 207-218, Dec 2003.

Stallman, H. M. Prevalence of psychological distress in university students--implications for service delivery. *Aust Fam Physician*, 37, n. 8, p. 673-677, Aug 2008.

Stevenson, J. L.; Hart, K. R. Psychometric Properties of the Autism-Spectrum Quotient for Assessing Low and High Levels of Autistic Traits in College Students. *J Autism Dev Disord*, 47, n. 6, p. 1838-1853, Jun 2017.

Sungur, A. O.; Vorckel, K. J.; Schwarting, R. K.; Wohn, M. Repetitive behaviors in the Shank1 knockout mouse model for autism spectrum disorder: developmental aspects and effects of social context. *J Neurosci Methods*, 234, p. 92-100, Aug 30 2014.

Szatmari, P. Asperger's syndrome: diagnosis, treatment, and outcome. *Psychiatr Clin North Am*, 14, n. 1, p. 81-93, Mar 1991.

Szatmari, P. A review of the DSM-III-R criteria for autistic disorder. *J Autism Dev Disord*, 22, n. 4, p. 507-523, Dec 1992.

Thurm, A.; Swedo, S. E. The importance of autism research. *Dialogues Clin Neurosci*, 14, n. 3, p. 219-222, Sep 2012.

Tierney, E.; Remaley, A.; Thurm, A.; Jager, L. *et al.* Sterol and lipid analyses identifies hypolipidemia and apolipoprotein disorders in autism associated with adaptive functioning deficits. *Translational Psychiatry*, 11, 09/09 2021.

Tong, H.; Zhang, X.; Meng, X.; Lu, L. *et al.* Simvastatin Inhibits Activation of NADPH Oxidase/p38 MAPK Pathway and Enhances Expression of Antioxidant Protein in Parkinson Disease Models. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 11, 05/22 2018.

Tsai, P. T.; Hull, C.; Chu, Y.; Greene-Colozzi, E. *et al.* Autistic-like behaviour and cerebellar dysfunction in Purkinje cell Tsc1 mutant mice. *Nature*, 488, n. 7413, p. 647-651, Aug 30 2012.

Tuchman, R.; Cuccaro, M.; Alessandri, M. Autism and epilepsy: historical perspective. *Brain Dev*, 32, n. 9, p. 709-718, Oct 2010.

Tung, E. W.; Winn, L. M. Valproic acid increases formation of reactive oxygen species and induces apoptosis in postimplantation embryos: a role for oxidative stress in valproic acid-induced neural tube defects. *Mol Pharmacol*, 80, n. 6, p. 979-987, Dec 2011.

Turner, R. M.; Pirmohamed, M. Statin-Related Myotoxicity: A Comprehensive Review of Pharmacokinetic, Pharmacogenomic and Muscle Components. *J Clin Med*, 9, n. 1, Dec 20 2019.

Ure, A.; Rose, V.; Bernie, C.; Williams, K. Autism: One or many spectrums? *J Paediatr Child Health*, 54, n. 10, p. 1068-1072, Oct 2018.

Uttara, B.; Singh, A. V.; Zamboni, P.; Mahajan, R. T. Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Curr Neuropharmacol*, 7, n. 1, p. 65-74, Mar 2009.

Veenstra-Vanderweele, J.; Muller, C. L.; Iwamoto, H.; Sauer, J. E. *et al.* Autism gene variant causes hyperserotonemia, serotonin receptor hypersensitivity, social impairment and repetitive behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, n. 14, p. 5469-5474, Apr 3 2012.

Vicknair, J.; Elkersh, D.; Yancey, K.; C., B. M. The use of social networking websites as a recruiting tool for employers. *American Journal of Business Education*, 3, n. 11, p. 7-12, 2010.

Volkmar, F. R. Childhood disintegrative disorder: issues for DSM-IV. *J Autism Dev Disord*, 22, n. 4, p. 625-642, Dec 1992.

Volkmar, F. R.; Cicchetti, D. V.; Bregman, J.; Cohen, D. J. Three diagnostic systems for autism: DSM-III, DSM-III-R, and ICD-10. *J Autism Dev Disord*, 22, n. 4, p. 483-492, Dec 1992.

Volkmar, F. R.; Mcpartland, J. C. From Kanner to DSM-5: autism as an evolving diagnostic concept. *Annu Rev Clin Psychol*, 10, p. 193-212, 2014.

Volkmar, F. R.; Nelson, D. S. Seizure disorders in autism. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, 29, n. 1, p. 127-129, Jan 1990.

Volkmar, F. R.; Reichow, B.; Mcpartland, J. Classification of autism and related conditions: progress, challenges, and opportunities. *Dialogues Clin Neurosci*, 14, n. 3, p. 229-237, Sep 2012.

Wassif, C. A.; Krakowiak, P. A.; Wright, B. S.; Gewandter, J. S. *et al.* Residual cholesterol synthesis and simvastatin induction of cholesterol synthesis in Smith-Lemli-Opitz syndrome fibroblasts. *Mol Genet Metab*, 85, n. 2, p. 96-107, Jun 2005.

Wells, P. G.; Mccallum, G. P.; Lam, K. C.; Henderson, J. T. *et al.* Oxidative DNA damage and repair in teratogenesis and neurodevelopmental deficits. *Birth Defects Res C Embryo Today*, 90, n. 2, p. 103-109, Jun 2010.

Wenhardt, T.; Bethlehem, R. a. I.; Baron-Cohen, S.; Altenmuller, E. Autistic traits, resting-state connectivity, and absolute pitch in professional musicians: shared and distinct neural features. *Mol Autism*, 10, p. 20, 2019.

White, S. W.; Ollendick, T. H.; Bray, B. C. College students on the autism spectrum: prevalence and associated problems. *Autism*, 15, n. 6, p. 683-701, Nov 2011.

Wing, L. Asperger's syndrome: a clinical account. *Psychol Med*, 11, n. 1, p. 115-129, Feb 1981.

Woodbury-Smith, M. R.; Robinson, J.; Wheelwright, S.; Baron-Cohen, S. Screening adults for Asperger Syndrome using the AQ: a preliminary study of its diagnostic validity in clinical practice. *J Autism Dev Disord*, 35, n. 3, p. 331-335, Jun 2005.

Wozniak, R. H.; Leezenbaum, N. B.; Northrup, J. B.; West, K. L. *et al.* The development of autism spectrum disorders: variability and causal complexity. *Wiley Interdiscip Rev Cogn Sci*, 8, n. 1-2, Jan 2017.

Wurzman, R.; Forcelli, P. A.; Griffey, C. J.; Kromer, L. F. Repetitive grooming and sensorimotor abnormalities in an ephrin-A knockout model for Autism Spectrum Disorders. *Behav Brain Res*, 278, p. 115-128, Feb 1 2015.

Xie, S.; Karlsson, H.; Dalman, C.; Widman, L. *et al.* Family History of Mental and Neurological Disorders and Risk of Autism. *JAMA Netw Open*, 2, n. 3, p. e190154, Mar 1 2019.

Zablotsky, B.; Black, L. I.; Maenner, M. J.; Schieve, L. A. *et al.* Estimated Prevalence of Autism and Other Developmental Disabilities Following Questionnaire Changes in the 2014 National Health Interview Survey. *Natl Health Stat Report*, n. 87, p. 1-20, Nov 13 2015.

Zerbo, O.; Qian, Y.; Yoshida, C.; Grether, J. K. *et al.* Maternal Infection During Pregnancy and Autism Spectrum Disorders. *J Autism Dev Disord*, 45, n. 12, p. 4015-4025, Dec 2015.

Zhang, T.; Sidorchuk, A.; Sevilla-Cermeno, L.; Vilaplana-Perez, A. *et al.* Association of Cesarean Delivery With Risk of Neurodevelopmental and Psychiatric Disorders in the Offspring: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Netw Open*, 2, n. 8, p. e1910236, Aug 2 2019.

Zhou, X. H.; Li, Y. J.; Ou, J. J.; Li, Y. M. Association between maternal antidepressant use during pregnancy and autism spectrum disorder: an updated meta-analysis. *Mol Autism*, 9, p. 21, 2018.

Zinellu, A.; Mangoni, A. A. A Systematic Review and Meta-Analysis of the Effect of Statins on Glutathione Peroxidase, Superoxide Dismutase, and Catalase. *Antioxidants (Basel)*, 10, n. 11, Nov 19 2021.

ANEXO A – FORMULÁRIO ETIOLÓGICO E TCLE**FORMULÁRIO ETIOLÓGICO / TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA**

NOME _____ Data de nascimento: ____
/ ____ / ____

Local de atendimento: _____ **Pontuação ASQ:** _____

Sexo: M () F () Idade: _____ Raça: branca () negra () oriental () outra

Nome _____ Responsável: _____ -

Tel. residencial: (____) _____ - _____ Celular: (____) _____ - _____ Outro: (____) _____ -

História familiar:

Deficiência intelectual: Sim () Não (); Transtorno Psiquiátrico: Sim () Não () → THB
() Esquizofrenia ()

Transtorno do espectro autista: Sim () Não (); Atraso na fala: Sim () Não ()

Pais consanguíneos: Sim () Não () Idade materna quando teve o filho: _____

Idade Paterna: _____

Fatores etiológicos pré-natais:

Uso de álcool: Sim () Não (); Cigarro: Sim () Não (); Entorpecentes: Sim () Não
() _____

Medicamentos: Sim () Não () → Antidepressivos (); Anticonvulsivantes ()

Infecções durante a gestação: Sim () Não () Qual?: CMV () Rubéola ()
)Toxoplasmose () _____

Exposição a agrotóxicos: Sim () Não ()

Epilepsia: Sim () Não () → Crises Febris ()

Tratamento para infertilidade: Sim () Não () → FIV: Sim () Não ()

Parto: Normal (); Cesário () → A Termo () Prematuro (); Semanas _____

Exames laboratoriais: _____: Colesterol total:
_____ VR _____; LDL: _____ VR _____

HDL: _____ VR _____ Triglicérides: _____ VR _____; Vit

D: _____ VR _____; **Pb:** _____ VR _____

Cromatografia

AA:

Diagnóstico neuroimagem: USG TF (); TC (); RM ()

**Diagnóstico genético: Cariótipo (); PCR X-frágil (); CGH-Array (); Outro ();
EIM(); Teste do Pezinho ()**

Exame físico

Microcefalia: Sim () Não (); Macrocrania: Sim () Não (); Dismorfismos: Sim ()
Não ()

SETOR DE NEUROLOGIA INFANTIL

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, _____, RG n. _____, residente à Av./Rua _____ n. _____, complemento _____, Bairro _____, na cidade de _____, por meio deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, consinto que o Dr. _____ tire fotografias, faça vídeos e outros tipos de imagens de mim, sobre o meu caso clínico. Consinto que estas imagens sejam utilizadas para finalidade didática e científica, divulgadas em aulas, palestras, conferências, cursos, congressos, etc... e também publicadas em livros, artigos, portais de internet, revistas científicas e similares, podendo inclusive ser mostrado o meu rosto, o que pode fazer com que eu seja reconhecido.

Consinto também que as imagens de meus exames, como radiografias, tomografias computadorizadas, ressonâncias magnéticas, ultrassons, eletromiografias, histopatológicos (exame no microscópio da peça cirúrgica retirada) e outros, sejam utilizadas e divulgadas.

Caso surja, em algum momento, algum exame que possa auxiliar no diagnóstico e/ou tratamento, meu ou de meu filho (a) consinto, mediante explicação pormenorizada a respeito do exame a ser realizado, a sua realização.

Este consentimento pode ser revogado, sem qualquer ônus ou prejuízo à minha pessoa, a meu pedido ou solicitação, desde que a revogação ocorra antes da publicação.

Fui esclarecido de que não receberei nenhum ressarcimento ou pagamento pelo uso das minhas imagens e também compreendi que o Dr. _____ e a equipe de profissionais que me atende e atenderá durante todo o tratamento não terá qualquer tipo de ganhos financeiros com a exposição da minha imagem nas referidas publicações.

Local, _____ de _____ de 2____.

Assinatura*: _____

Paciente / Responsável:

CPF

RG

ANEXO B – CRITÉRIOS DIAGNÓSTICOS PARA O TEA AO LONGO DA HISTÓRIA DE ACORDO COM O MANUAL DIAGNÓSTICO E ESTATÍSTICO DE TRANSTORNOS MENTAIS.

CrITÉrios diagnÓsticos para o Autismo Infantil de acordo com o DSM-III - 1980

InÍcio dos sintomas antes dos 30 meses de idade;
 Falta de responsividade a outras pessoas (autismo);
 Déficits grosseiros no desenvolvimento da linguagem;
 Se a fala estiver presente, essa se caracteriza por padrões peculiares como ecolalias imediatas ou tardias, ausÊncia de linguagem metafÓrica e reversão pronominal;
 Respostas bizarras a vÁrios estÍmulos ambientais p. ex. resistÊncia a mudanÇas, interesse peculiar a objetos animados ou inanimados;
 AusÊncia de alucinaÇões, perda de associaÇões ou incoerÊncias tipicamente encontradas na esquizofrenia.

CrITÉrios diagnÓstico para o transtorno autÍstico de acordo com o Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders 3rd edition Revision – DSM-III-R - 1992

Pelo menos oito dos seguintes 16 itens devem estar presentes, incluindo ao menos dois itens do A, um item do B e um do C.

Comprometimento qualitativo da interaçãO social recÍproca (os exemplos entre parÊnteses sãO organizados de modo que os primeiros sãO mais comuns aos casos mais precoces e graves e os Últimos aos casos mais tardios e leves) manifestados da seguinte maneira:

AusÊncia marcante de noÇãO da existÊncia ou das emoÇões de outras pessoas (trata as pessoas como um mÓvel ou objeto, nãO consegue perceber o estresse emocional de outra pessoa, aparentemente nãO tem noÇãO da necessidade de privacidade por parte das outras pessoas);

AusÊncia ou busca anormal por conforto em momentos de estresse emocional (nãO busca conforto mesmo quando doente, ferido ou cansado, procura conforto de maneira estereotipada, por exemplo, dizendo “queijo, queijo, queijo” sempre que se fere);

AusÊncia ou comprometimento da imitaÇãO (nãO acena, nãO imita os pais nas atividades diÁrias, imitaÇãO mecânica da ações de terceiros e fora do contexto);

AusÊncia ou anormalidade na brincadeira social (nãO participa ativamente das brincadeiras prÓprias da idade; prefere brincadeiras e atividade solitÁrias, envolve-se com outras crianÇas apenas de forma mecânica), e

Comprometimento grosseiro na habilidade de formar relações de amizade (ausência de interesse em se relacionar de forma amigável com pares, demonstra falta de entendimento das convenções sociais, por exemplo, lê uma lista telefônica para uma plateia desinteressada).

Comprometimento qualitativo na comunicação verbal e não-verbal e em atividades imaginativas (os exemplos entre parênteses são organizados de modo que os primeiros são mais comuns aos casos mais precoces e graves e os últimos aos casos mais tardios e leves) manifestados da seguinte maneira:

Ausência de comunicação (ausência de lalação, expressão facial, gestos, mímica ou linguagem falada);

Anormalidade marcante na comunicação não-verbal como contato visual, uso de expressões faciais, linguagem corporal, gestual ou iniciativas buscando interação social (não demonstra, através de gestos antecipatórios, pedidos de “colo”, se enrijece quando abraçado, não apresenta contato visual ou sorri quando realiza aproximação social, não cumprimenta parentes ou visitas, fixação do olhar em situações sociais);

Ausência de atividades imaginativas como representar papéis, atividades imaginativas relacionadas a animais, e falta de interesse em histórias relacionadas a eventos imaginários;

Anormalidade marcante na produção da fala, incluindo volume, timbre, ritmo e entonação (fala em tom monótono e timbre agudo seriam alguns exemplos);

Anormalidade marcante na forma ou conteúdo da fala incluindo uso restrito e repetitivo da fala (ecolalias imediatas ou repetição mecânica de um comercial de televisão), referir-se a sim mesmo na terceira pessoa (por exemplo falar “você quer um biscoito” no lugar de “eu quero um biscoito”), uso idiossincrático de palavras ou frases e conversas a respeito de assuntos fora do contexto (por exemplo começar a falar nos horários de saída de trens enquanto se encontra em uma conversa sobre portas), e

Comprometimento marcante na habilidade em iniciar ou manter uma conversa com outra pessoa a despeito de possuir uma fala adequada.

Restrição marcante no repertório de atividades ou interesses que se manifestam por:

Movimentos corporais estereotipados (por exemplo balançar ou torcer as mãos, girar, balançar o corpo ou movimentos corporais complexos);

Preocupação persistente com partes de objetos (por exemplo cheirar ou lambe objetos, sentir de maneira repetida a textura dos objetos, fixação por girar as rodas de um carrinho), conexão a objetos não-usuais (por exemplo carregar insistentemente um pedaço de barbante);

Alteração comportamental marcante em decorrência de alterações triviais no ambiente (por exemplo a alteração do lugar de um vaso);

Insistência em seguir rotinas detalhadamente (por exemplo insistir a utilização sempre do mesmo caminho em um passeio);

Repertório marcadamente restrito de interesses e preocupações restritas a uma estreita faixa de interesses (por exemplo interesse em enfileirar objetos ou coletar informações e fatos unicamente relacionados a astronomia).

Início dos sintomas durante a infância ou idade pré-escolar. Especificar caso o início dos sintomas ocorra após os 36 meses de idade.

Critérios diagnóstico para o transtorno autístico e síndromes relacionadas de acordo com o *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders 4th edition – DSM-IV – 2000*

Transtorno autístico

Somar um total de seis (ou mais) itens dos marcadores (1), (2), e (3), com pelo menos dois do (1), e um do (2) e um do (3).

Comprometimento marcante da interação social manifestada por pelo menos dois dos seguintes itens:

Comprometimento marcante no uso de múltiplos comportamentos não-verbais, tais como contato visual, expressão facial, postura corpora e gestos para regular a interação social;

Dificuldade em desenvolver relações de companheirismo apropriadas para o nível de desenvolvimento;

Ausência de busca espontânea em compartilhar satisfação, interesses ou realizações com outras pessoas (por exemplo dificuldades em mostrar, trazer ou apontar para objetos de interesse);

Ausência de reciprocidade social ou emocional.

Comprometimento qualitativo na comunicação manifestada por pelo menos um dos seguintes itens:

Atraso ou total ausência no desenvolvimento da fala (não acompanhada pela tentativa de compensação através de métodos alternativos de comunicação como gestos ou mímica);

Em indivíduos com fala adequada, marcante comprometimento na habilidade em iniciar ou manter a conversação com outras pessoas;

Uso estereotipado, repetitivo ou idiossincrático da linguagem;

Ausência de um repertório variado de ações, brincadeiras imaginativas ou imitações sociais apropriadas para o nível de desenvolvimento;

Padrão restrito, repetitivo ou estereotipado de comportamentos, interesses e atividade manifestadas por pelo menos um dos seguintes itens:

Preocupação com um ou mais padrões estereotipados e restritos de interesse que sejam anormais em intensidade ou foco;

Aderência aparentemente inflexível a rotinas ou rituais específicos e não-funcionais;

Maneirismos motores estereotipados e repetitivos (por exemplo balançar ou torcer as mãos, girar, balançar o corpo ou movimentos corporais complexos);

Preocupação persistente com partes de objetos.

Atraso ou funcionamento anormal em pelo menos uma das seguintes áreas, com início dos sintomas antes dos três anos de idade.

Interação social;

Linguagem utilizada na comunicação social ou;

Atividades simbólicas ou imaginativas.

O distúrbio não é melhor classificado como síndrome de Rett, síndrome de Asperger ou Psicose desintegrativa de Heller.

Transtorno invasivo do desenvolvimento não especificado

Esta categoria deve ser utilizada quando existe um grave ou pervasivo comprometimento no desenvolvimento da interação social recíproca ou das habilidades de comunicação verbal e não-verbal ou ainda quando padrões de comportamentos estereotipados e restritos de atividades ou interesses estão presentes, mas que não se encaixa com nenhum tipo específico de transtorno invasivo do desenvolvimento, com esquizofrenia, personalidade esquizotípica ou transtorno de personalidade aversiva. Esta categoria inclui, por exemplo o autismo atípico – apresentações que não preenchem critérios para transtorno autístico devido ao início tardio dos sintomas, sintomatologia atípica ou sintomas subliminares.

Síndrome de Asperger

Comprometimento qualitativo da interação social manifestada por pelo menos dois dos seguintes itens:

Comprometimento marcante no uso de múltiplos comportamentos não-verbais, tais como contato visual, expressão facial, postura corpora e gestos para regular a interação social;

Falha em desenvolver relações de companheirismo apropriadas para o nível de desenvolvimento;

Ausência de busca espontânea em compartilhar satisfação, interesses ou realizações com outras pessoas (por exemplo dificuldades em mostrar, trazer ou apontar para objetos de interesse);

Ausência de reciprocidade social ou emocional.

Padrão restrito, repetitivo ou estereotipado de comportamentos, interesses e atividade manifestadas por pelo menos um dos seguintes itens:

Preocupação com um ou mais padrões estereotipados e restritos de interesse que sejam anormais em intensidade ou foco;

Aderência aparentemente inflexível a rotinas ou rituais específicos e não-funcionais;

Maneirismos motores estereotipados e repetitivos (por exemplo balançar ou torcer as mãos, girar, balançar o corpo ou movimentos corporais complexos);

Preocupação persistente com partes de objetos.

O distúrbio causa comprometimento clínico significativo nas áreas social, ocupacional ou outra áreas importantes do funcionamento.

Não existe um atraso significativo no desenvolvimento da fala (por exemplo palavras isoladas aos dois anos ou frases comunicativas após os três anos de idade).

Não existe um atraso clínico significativo no desenvolvimento cognitivo ou no desenvolvimento de habilidades de auto-cuidado apropriadas para a idade, comportamentos adaptativos (exceto interação social) e curiosidade em relação ao ambiente.

Os sintomas encontrados não preenchem critérios para nenhum outro tipo específico de transtorno invasivo do desenvolvimento ou esquizofrenia.

Síndrome de Rett

Todos os seguintes:

Desenvolvimento prenatal e perinatal aparentemente normal;

Desenvolvimento psicomotor normal nos primeiros cinco meses após o nascimento;

Perímetro cefálico com circunferência normal ao nascimento.

Início de todos os sintomas abaixo após período de desenvolvimento normal:

Desaceleração do crescimento do perímetro cefálico entre os cinco e 48 meses de idade;

Perda do uso funcional das mãos previamente adquirido entre os cinco e 30 meses de vida com o subsequente desenvolvimento de movimentos manuais estereotipados (movimentos de balanço ou de “lavar” as mãos);

Perda do engajamento social precoce durante o curso da doença (embora a interação social possa se desenvolver mais tardiamente);

Aparecimento de incoordenação de marcha ou movimentos anormais de tronco;

Comprometimento grave na linguagem expressiva ou receptiva com retardo psicomotor grave.

Transtorno Desintegrativo da Infância (Psicose Desintegrativa de Heller)

Desenvolvimento aparentemente normal até os dois anos de idade manifestado pela presença de comunicação verbal e não-verbal apropriada para a idade, relacionamento social, atividades e comportamento adaptativo;

Perda clinicamente significativa das habilidades previamente adquiridas (antes dos 10 anos de idade) em pelo menos duas das seguintes áreas:

Linguagem expressiva ou receptiva;

Habilidades sociais ou comportamento adaptativo;

Controle vesical ou esfinteriano;

Atividades;

Habilidades motoras.

Anormalidades no funcionamento de pelo menos duas das seguintes áreas:

Comprometimento qualitativo na interação social (por exemplo comprometimento nos comportamentos não-verbais, falha no desenvolvimento de relacionamentos com pares, falta de reciprocidade social ou emocional);

Comprometimento qualitativo na comunicação (por exemplo atraso ou falha na linguagem falada, incapacidade em iniciar ou manter uma conversa, uso de linguagem de maneira estereotipada ou repetitiva, falta de atividades imaginativas);

Padrões restritos, repetitivos e estereotipados de comportamentos, interesses e atividades incluindo estereotipias motoras ou maneirismos.

O distúrbio não é melhor justificado por outro transtorno específico do desenvolvimento ou esquizofrenia.

Critérios diagnóstico para o TEA de acordo com o Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders 5th edition – DSM5 – 2013

Transtorno do Espectro Autista

Déficits persistentes na comunicação social e interação por meio de múltiplos contextos, conforme manifestados a seguir, atualmente ou pela história clínica (os exemplos são ilustrativos e não exaustivos)

Déficits na reciprocidade socioemocional , variando, por exemplo da abordagem social anormal e do fracasso das conversas normais que envolvem ida e volta; redução no compartilhamento de interesses, emoções ou afetos; fracasso em iniciar ou responder a tentativas de interação social;

Déficits nos comportamentos comunicativos não verbais utilizados para a interação social, variando, por exemplo, da comunicação verbal e não verbal mal integrada, anormalidades no contato visual e na linguagem corporal ou déficits na compreensão e uso de de gestos; a uma total falta de expressões faciais e comunicação não verbal;

Déficits no desenvolvimento, na manutenção e na compreensão de relacionamentos , variando, por exemplo de dificuldades no ajuste comportamental para atender aos vários contextos sociais; às dificuldades em compartilhar brincadeiras imaginativas, dificuldade em fazer amizades e ausência de interesse por pares.

Padrões restritos e repetitivos de comportamento, interesses ou atividades, manifestados por pelo menos dois dos seguintes, atualmente ou pela história (os exemplos são ilustrativos, não exaustivos)

Movimentos motores estereotipados ou repetitivos, uso de objetos ou fala (por exemplo, estereotipias motoras simples, alinhamento de brinquedos ou objetos móveis, ecolalia, frases idiossincráticas);

Insistência em manter uma rotina, adesão inflexível às rotinas ou padrões ritualizados ou comportamento verbal não verbal (por exemplo, aflição extrema com pequenas mudanças, dificuldades com transições, padrões rígidos de pensamento, rituais de saudação, necessidade de seguir o mesmo caminho ou comer todos os dias);

Padrão altamente restrito de interesses, interesses fixos que são anormais em intensidade ou foco (por exemplo, forte apego ou preocupação a objetos incomuns, interesse excessivamente circunscrito ou perseverativo);

Hiper ou hiporreatividade à entrada sensorial ou interesses incomuns em aspectos sensoriais do ambiente (por exemplo, aparente indiferença à dor/temperatura, resposta adversa aos sons

ou texturas específicas, cheirar ou tocar objetos excessivamente, fascinação visual com luzes ou movimentos).

Os sintomas devem estar presentes no período inicial do desenvolvimento (mas podem não se manifestar completamente até que as demandas sociais excedam as capacidades limitadas ou possam ser mascaradas pelas estratégias aprendidas na vida adulta).

Os sintomas causam prejuízos clinicamente significativos em áreas ou sociais, ou ocupacionais ou outras áreas importantes do funcionamento atual.

Esses distúrbios não são melhor explicados pela deficiência intelectual (distúrbio intelectual do desenvolvimento) ou pelo atraso global no desenvolvimento. Deficiência intelectual e transtorno do espectro autista frequentemente podem ser concomitantes. Para identificar comorbidades diagnósticas do transtorno do espectro do autismo e da deficiência intelectual, a comunicação social deve estar abaixo da esperada para o nível geral de desenvolvimento.

Nota: Indivíduos com um diagnóstico bem estabelecido de DSM-IV de transtorno autista, transtorno de Asperger ou transtorno invasivo do desenvolvimento sem outra especificação devem receber o diagnóstico de transtorno do espectro do autismo. Indivíduos que têm déficits acentuados na comunicação social, mas cujos sintomas não satisfazem os critérios para o transtorno do espectro do autismo, devem ser avaliados quanto ao transtorno de comunicação social (pragmático).

Nível de gravidade 1 – “Necessidade de pouco apoio”.

Sem suportes, os déficits na comunicação social causam deficiências visíveis. Dificuldade em iniciar interações sociais e exemplos claros de resposta atípica ou malsucedida à aberturas sociais de outros. Pode parecer ter diminuído o interesse em interações sociais.

Por exemplo, uma pessoa que é capaz de falar em frases completas e se engajar em comunicação. Mas cuja conversa para frente e para trás com os outros falham, e cujas tentativas de fazer amigos são estranhas e normalmente malsucedidas.

A inflexibilidade do comportamento causa interferência significativa no funcionamento em um ou mais contextos. Dificuldade de alternar entre atividades. Problemas de organização e planejamento dificultam a independência.

Nível de gravidade 2 – “Necessidade de apoio substancial”

Déficits acentuados nas habilidades de comunicação social verbal e não verbal; deficiências sociais aparentes mesmo com suportes no local; iniciação limitada de interações sociais; e respostas reduzidas ou anormais à aberturas sociais de outros.

Por exemplo, uma pessoa que fala frases simples, cuja interação é limitada a interesses especiais restritos e que tem uma comunicação não verbal marcadamente estranha.

A inflexibilidade do comportamento, a dificuldade em lidar com a mudança ou outros comportamentos restritos/ repetitivos aparecem com frequência suficiente para serem óbvios para o observador casual e interferir no funcionamento em uma variedade de contextos. Aflição e/ ou dificuldade em mudar o foco ou a ação.

Nível de gravidade 3 – “Necessidade de apoio muito substancial”

Os déficits severos nas habilidades de comunicação social verbal e não verbal causam graves prejuízos no funcionamento, iniciação muito limitada das interações sociais e resposta mínima às aberturas sociais de outros. Por exemplo, uma pessoa com poucas palavras de fala inteligível que raramente inicia interação e, quando o faz, faz abordagens incomuns para atender apenas às necessidades e responde apenas às abordagens sociais muito diretas.

A inflexibilidade do comportamento, a extrema dificuldade em lidar com a mudança ou outros comportamentos restritos/ repetitivos interferem de maneira marcante no funcionamento de todas as esferas. Grande aflição/ dificuldade mudando o foco ou a ação.

ANEXO C – Childhood Autism Rating Scale – CARS

I Relações pessoais:

1 Nenhuma evidência de dificuldade ou anormalidade nas relações pessoais: O comportamento da criança é adequado à sua idade. Alguma timidez, nervosismo ou aborrecimento podem ser observados quando é dito à criança o que fazer, mas não em grau atípico;

2 Relações levemente anormais: A criança pode evitar olhar o adulto nos olhos, evitar o adulto ou ter uma reação exagerada se a interação é forçada, ser excessivamente tímida, não responder ao adulto como esperado ou agarrar-se ao pai um pouco mais que a maioria das crianças da mesma idade;

3 Relações moderadamente anormais: Às vezes, a criança demonstra indiferença (parece ignorar o adulto). Outras vezes, tentativas persistentes e vigorosas são necessárias para se conseguir a atenção da criança. O contato iniciado pela criança é mínimo;

4 Relações gravemente anormais: A criança está constantemente indiferente ou inconsciente ao que o adulto está fazendo. Ela quase nunca responde ou inicia contato com o adulto. Somente a tentativa mais persistente para atrair a atenção tem algum efeito.

II. Imitação:

1 Imitação adequada: A criança pode imitar sons, palavras e movimentos, os quais são adequados para o seu nível de habilidade;

2 Imitação levemente anormal: Na maior parte do tempo, a criança imita comportamentos simples como bater palmas ou sons verbais isolados; ocasionalmente imita somente após estimulação ou com atraso;

3 Imitação moderadamente anormal: A criança imita apenas parte do tempo e requer uma grande dose de persistência ou ajuda do adulto; freqüentemente imita apenas após um tempo (com atraso);

4 Imitação gravemente anormal: A criança raramente ou nunca imita sons, palavras ou movimentos mesmo com estímulo e assistência.

III. Resposta emocional:

1 Resposta emocional adequada à situação e à idade: A criança demonstra tipo e grau adequados de resposta emocional, indicada por uma mudança na expressão facial, postura e conduta;

2 Resposta emocional levemente anormal: A criança ocasionalmente apresenta um tipo ou grau inadequados de resposta emocional. Às vezes, suas reações não estão relacionadas a objetos ou a eventos ao seu redor;

3 Resposta emocional moderadamente anormal: A criança demonstra sinais claros de resposta emocional inadequada (tipo ou grau). As reações podem ser bastante inibidas ou excessivas e sem relação com a situação; pode fazer caretas, rir ou tornar-se rígida até mesmo quando não estejam presentes objetos ou eventos produtores de emoção;

4 Resposta emocional gravemente anormal: As respostas são raramente adequadas à situação. Uma vez que a criança atinja um determinado humor, é muito difícil alterá-lo. Por outro lado, a criança pode demonstrar emoções diferentes quando nada mudou

IV. Uso corporal:

1 Uso corporal adequado à idade: A criança move-se com a mesma facilidade, agilidade e coordenação de uma criança normal da mesma idade;

2 Uso corporal levemente anormal: Algumas peculiaridades podem estar presentes, tais como falta de jeito, movimentos repetitivos, pouca coordenação ou a presença rara de movimentos incomuns;

3 Uso corporal moderadamente anormal: Comportamentos que são claramente estranhos ou incomuns para uma criança desta idade podem incluir movimentos estranhos com os dedos, postura peculiar dos dedos ou corpo, olhar fixo, beliscar o corpo, auto-agressão, balanceio, girar ou caminhar nas pontas dos pés;

4 Uso corporal gravemente anormal: Movimentos intensos ou freqüentes do tipo listado acima são sinais de uso corporal gravemente anormal. Estes comportamentos podem persistir apesar das tentativas de desencorajar as crianças a fazê-los ou de envolver a criança em outras atividades.

V. Uso de objetos:

1 Uso e interesse adequados por brinquedos e outros objetos: A criança demonstra interesse normal por brinquedos e outros objetos adequados para o seu nível de habilidade e os utiliza de maneira adequada;

2 Uso e interesse levemente inadequados por brinquedos e outros objetos: A criança pode demonstrar um interesse atípico por um brinquedo ou brincar com ele de forma inadequada, de um modo pueril (exemplo: batendo ou sugando o brinquedo);

3 Uso e interesse moderadamente inadequados por brinquedos e outros objetos: A criança pode demonstrar pouco interesse por brinquedos ou outros objetos, ou pode estar preocupada em usá-los de maneira estranha. Ela pode concentrar-se em alguma parte insignificante do brinquedo, tornar-se fascinada com a luz que reflete do mesmo, repetitivamente mover alguma parte do objeto ou exclusivamente brincar com ele;

4 Uso e interesse gravemente inadequados por brinquedos e outros objetos: A criança pode engajar-se nos mesmos comportamentos citados acima, porém com maior frequência e intensidade. É difícil distrair a criança quando ela está engajada nestas atividades inadequadas.

VI. Resposta a mudanças:

1 Respostas à mudança adequadas à idade: Embora a criança possa perceber ou comentar as mudanças na rotina, ela é capaz de aceitar estas mudanças sem angústia excessiva;

2 Respostas à mudança adequadas à idade levemente anormal: Quando um adulto tenta mudar tarefas, a criança pode continuar na mesma atividade ou usar os mesmos materiais;

3 Respostas à mudança adequadas à idade moderadamente anormal: A criança resiste ativamente a mudanças na rotina, tenta continuar sua antiga atividade e é difícil de distraí-la. Ela pode tornar-se infeliz e zangada quando uma rotina estabelecida é alterada;

4 Respostas à mudança adequadas à idade gravemente anormal: A criança demonstra reações graves às mudanças. Se uma mudança é forçada, ela pode tornar-se extremamente zangada ou não disposta a ajudar e responder com acessos de raiva.

VII. Resposta visual:

1 Resposta visual adequada: O comportamento visual da criança é normal e adequado para sua idade. A visão é utilizada em conjunto com outros sentidos como forma de explorar um objeto novo;

2 Resposta visual levemente anormal: A criança precisa, ocasionalmente, ser lembrada de olhar para os objetos. A criança pode estar mais interessada em olhar espelhos ou luzes do que o fazem seus pares, pode ocasionalmente olhar fixamente para o espaço, ou pode evitar olhar as pessoas nos olhos;

3 Resposta visual moderadamente anormal: A criança deve ser lembrada frequentemente de olhar para o que está fazendo, ela pode olhar fixamente para o espaço, evitar olhar as

peessoas nos olhos, olhar objetos de um ângulo incomum ou segurar os objetos muito próximos aos olhos;

4 Resposta visual gravemente anormal: A criança evita constantemente olhar para as pessoas ou para certos objetos e pode demonstrar formas extremas de outras peculiaridades visuais descritas acima.

VIII. Resposta auditiva:

1 Respostas auditivas adequadas para a idade: O comportamento auditivo da criança é normal e adequado para idade. A audição é utilizada junto com outros sentidos;

2 Respostas auditivas levemente anormais: Pode haver ausência de resposta ou uma resposta levemente exagerada a certos sons. Respostas a sons podem ser atrasadas e os sons podem necessitar de repetição para prender a atenção da criança. A criança pode ser distraída por sons externos;

3 Respostas auditivas moderadamente anormais: As respostas da criança aos sons variam. Frequentemente ignora o som nas primeiras vezes em que é feito. Pode assustar-se ou cobrir as orelhas ao ouvir alguns sons do cotidiano;

4 Respostas auditivas gravemente anormais: A criança reage exageradamente e/ou despreza sons num grau extremamente significativo, independente do tipo de som.

IX. Resposta e uso do paladar, olfato e tato:

1 Uso e resposta normais do paladar, olfato e tato: A criança explora novos objetos de um modo adequado a sua idade, geralmente sentindo ou olhando. Paladar ou olfato podem ser usados quando adequados. Ao reagir a pequenas dores do dia a dia, a criança expressa desconforto, mas não reage exageradamente;

2 Uso e resposta levemente anormais do paladar, olfato e tato: A criança pode persistir em colocar objetos na boca; pode cheirar ou provar/experimentar objetos não comestíveis. Pode ignorar ou ter reação levemente exagerada à uma dor mínima, para a qual uma criança normal expressaria somente desconforto;

3 Uso e resposta moderadamente anormais do paladar, olfato e tato: A criança pode estar moderadamente preocupada em tocar, cheirar ou provar objetos ou pessoas. A criança pode reagir demais ou muito pouco;

4 Uso e resposta gravemente anormais do paladar, olfato e tato: A criança está preocupada em cheirar, provar e sentir objetos, mais pela sensação do que pela

exploração ou uso normal dos objetos. A criança pode ignorar completamente a dor ou reagir muito fortemente a desconfortos leves.

X. Medo ou nervosismo:

1 Medo ou nervosismo normais: O comportamento da criança é adequado tanto à situação quanto à idade;

2 Medo ou nervosismo levemente anormais: A criança ocasionalmente demonstra muito ou pouco medo ou nervosismo quando comparada às reações de uma criança normal da mesma idade e em situação semelhante;

3 Medo ou nervosismo moderadamente anormais: A criança demonstra bastante mais ou bastante menos medo do que seria típico para uma criança mais nova ou mais velha em uma situação similar;

4 Medo ou nervosismo gravemente anormais: Medos persistem mesmo após experiências repetidas com eventos ou objetos inofensivos. É extremamente difícil acalmar ou confortar a criança. A criança pode, por outro lado, falhar em demonstrar consideração adequada aos riscos que outras crianças da mesma idade evitam.

XI. Comunicação verbal:

1 Comunicação verbal normal, adequada à idade e à situação;

2 Comunicação verbal levemente anormal: A fala demonstra um atraso global. A maior parte do discurso tem significado; porém, alguma ecolalia ou inversão pronominal podem ocorrer. Algumas palavras peculiares ou jargões podem ser usados ocasionalmente;

3 Comunicação verbal moderadamente anormal: A fala pode estar ausente. Quando presente, a comunicação verbal pode ser uma mistura de alguma fala significativa e alguma linguagem peculiar, tais como jargão, ecolalia ou inversão pronominal. As peculiaridades na fala significativa podem incluir questionamentos excessivos ou preocupação com algum tópico em particular;

4 Comunicação verbal gravemente anormal: Fala significativa não é utilizada. A criança pode emitir gritos estridentes e infantis, sons animais ou bizarros, barulhos complexos semelhantes à fala, ou pode apresentar o uso bizarro e persistente de algumas palavras reconhecíveis ou frases

XII. Comunicação não-verbal:

1 Uso normal da comunicação não-verbal adequado à idade e situação;

2 Uso da comunicação não-verbal levemente anormal: Uso imaturo da comunicação não-verbal; a criança pode somente apontar vagamente ou esticar-se para alcançar o que quer, nas mesmas situações nas quais uma criança da mesma idade pode apontar ou gesticular mais especificamente para indicar o que deseja;

3 Uso da comunicação não-verbal moderadamente anormal: A criança geralmente é incapaz de expressar suas necessidades ou desejos de forma não verbal, e não consegue compreender a comunicação não-verbal dos outros;

4 Uso da comunicação não-verbal gravemente anormal: A criança utiliza somente gestos bizarros ou peculiares, sem significado aparente, e não demonstra nenhum conhecimento dos significados associados aos gestos ou expressões faciais dos outros.

XIII. Nível de atividade:

1 Nível de atividade normal para idade e circunstâncias: A criança não é nem mais nem menos ativa que uma criança normal da mesma idade em uma situação semelhante;

2 Nível de atividade levemente anormal: A criança pode tanto ser um pouco irrequieta quanto um pouco “preguiçosa”, apresentando, algumas vezes, movimentos lentos. O nível de atividade da criança interfere apenas levemente no seu desempenho;

3 Nível de atividade moderadamente anormal: A criança pode ser bastante ativa e difícil de conter. Ela pode ter uma energia ilimitada ou pode não ir prontamente para a cama à noite. Por outro lado, a criança pode ser bastante letárgica e necessitar de um grande estímulo para mover-se;

4 Nível de atividade gravemente anormal: A criança exhibe extremos de atividade ou inatividade e pode até mesmo mudar de um extremo ao outro.

XIV. Nível e consistência da resposta intelectual:

1 A inteligência é normal e razoavelmente consistente em várias áreas: A criança é tão inteligente quanto crianças típicas da mesma idade e não tem qualquer habilidade intelectual ou problemas incomuns;

2 Funcionamento intelectual levemente anormal: A criança não é tão inteligente quanto crianças típicas da mesma idade; as habilidades apresentam-se razoavelmente regulares através de todas as áreas;

3 Funcionamento intelectual moderadamente anormal: Em geral, a criança não é tão inteligente quanto uma típica criança da mesma idade, porém a criança pode funcionar próximo do normal em uma ou mais áreas intelectuais;

4 Funcionamento intelectual gravemente anormal: Embora a criança geralmente não seja tão inteligente quanto uma criança típica da mesma idade, ela pode funcionar até mesmo melhor que uma criança normal da mesma idade em uma ou mais áreas.

XV. Impressões gerais:

1 Sem autismo: a criança não apresenta nenhum dos sintomas característicos do autismo;

2 Autismo leve: A criança apresenta somente um pequeno número de sintomas ou somente um grau leve de autismo;

3 Autismo moderado: A criança apresenta muitos sintomas ou um grau moderado de autismo;

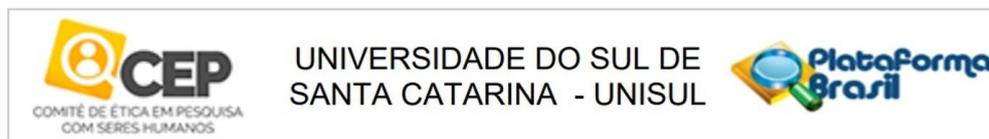
4 Autismo grave: a criança apresenta inúmeros sintomas ou um grau extremo de autismo

AValiação

Pode ser pontuada utilizando valores intermediários =1,5; 2,5; e 3,5.

15-30 = sem autismo 30-36 = autismo leve-moderado 36-60 = autismo grave

ANEXO D – Carta de aprovação do comitê de ética em pesquisa – CEP UNISUL (nº 3.256.100/CAAE: 01994918.9.0000.5369).



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Revisão de dados clínico-epidemiológicos de pacientes com Transtorno do Espectro Autista atendidos em um ambulatório terciário no Sul do Brasil entre 2010 e 2017.

Pesquisador: Jaime Lin

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 01994918.9.0000.5369

Instituição Proponente: Universidade do Sul de Santa Catarina - UNISUL

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.256.100

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

ANEXO E – Autism Spectrum Quocient – AQ

Autism-Spectrum Quotient

1. Prefiro fazer as coisas acompanhado do que sozinho.	Definitivamente concordo	Concordo ligeiramente	Discordo ligeiramente	Definitivamente discordo
2. Prefiro fazer as coisas sempre da mesma maneira.	Definitivamente concordo	Concordo ligeiramente	Discordo ligeiramente	Definitivamente discordo
3. Quando tento imaginar alguma coisa, é-me muito fácil criar uma imagem na mente.	Definitivamente concordo	Concordo ligeiramente	Discordo ligeiramente	Definitivamente discordo
4. Frequentemente, fico tão absorvido por uma coisa que perco de vista outras coisas.	Definitivamente concordo	Concordo ligeiramente	Discordo ligeiramente	Definitivamente discordo
5. Várias vezes reparo em pequenos sons que os outros não notam.	Definitivamente concordo	Concordo ligeiramente	Discordo ligeiramente	Definitivamente discordo
6. Geralmente reparo nas matrículas dos carros ou em cadeias de informação semelhantes.	Definitivamente concordo	Concordo ligeiramente	Discordo ligeiramente	Definitivamente discordo
7. As outras pessoas dizem-me frequentemente que o que eu disse foi indelicado, ainda que eu pense que tenha sido educado.	Definitivamente concordo	Concordo ligeiramente	Discordo ligeiramente	Definitivamente discordo
8. Quando estou a ler uma história, imagino com facilidade qual poderá ser o aspecto das personagens.	Definitivamente concordo	Concordo ligeiramente	Discordo ligeiramente	Definitivamente discordo
9. Sou fascinado por datas.	Definitivamente concordo	Concordo ligeiramente	Discordo ligeiramente	Definitivamente discordo
10. Num grupo social, consigo facilmente manter-me a par das conversas de várias pessoas diferentes.	Definitivamente concordo	Concordo ligeiramente	Discordo ligeiramente	Definitivamente discordo
11. Acho as situações sociais fáceis.	Definitivamente concordo	Concordo ligeiramente	Discordo ligeiramente	Definitivamente discordo
12. Tenho tendência a reparar em detalhes que os outros não notam.	Definitivamente concordo	Concordo ligeiramente	Discordo ligeiramente	Definitivamente discordo

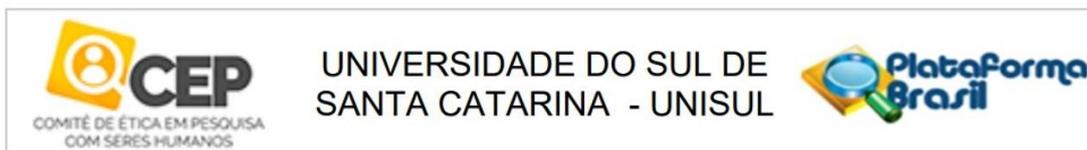
13. Preferia ir a uma biblioteca que a uma festa.	Definitivamente concordo	Concordo ligeiramente	Discordo ligeiramente	Definitivamente discordo
14. Acho que inventar histórias é fácil.	Definitivamente concordo	Concordo ligeiramente	Discordo ligeiramente	Definitivamente discordo
15. Sinto-me mais atraído por pessoas do que por coisas.	Definitivamente concordo	Concordo ligeiramente	Discordo ligeiramente	Definitivamente discordo
16. Tenho tendência a ter interesses fortes, e fico irritado se não posso persegui-los.	Definitivamente concordo	Concordo ligeiramente	Discordo ligeiramente	Definitivamente discordo
17. Aprecio as conversas de café.	Definitivamente concordo	Concordo ligeiramente	Discordo ligeiramente	Definitivamente discordo
18. Quando falo, nem sempre é fácil para os outros conseguirem interceptar-me para poderem falar.	Definitivamente concordo	Concordo ligeiramente	Discordo ligeiramente	Definitivamente discordo
19. Os números fascinam-me.	Definitivamente concordo	Concordo ligeiramente	Discordo ligeiramente	Definitivamente discordo
20. Quando estou a ler uma história, acho difícil desvendar as intenções das personagens.	Definitivamente concordo	Concordo ligeiramente	Discordo ligeiramente	Definitivamente discordo
21. Não gosto particularmente de ler ficção.	Definitivamente concordo	Concordo ligeiramente	Discordo ligeiramente	Definitivamente discordo
22. Acho difícil fazer amigos novos.	Definitivamente concordo	Concordo ligeiramente	Discordo ligeiramente	Definitivamente discordo
23. Estou sempre a encontrar padrões nas coisas.	Definitivamente concordo	Concordo ligeiramente	Discordo ligeiramente	Definitivamente discordo
24. Preferia ir ao teatro do que a um museu.	Definitivamente concordo	Concordo ligeiramente	Discordo ligeiramente	Definitivamente discordo
25. Não me aborrece que a minha rotina seja perturbada.	Definitivamente concordo	Concordo ligeiramente	Discordo ligeiramente	Definitivamente discordo
26. Frequentemente reparo que não sei como manter uma conversa.	Definitivamente concordo	Concordo ligeiramente	Discordo ligeiramente	Definitivamente discordo
27. Acho fácil “ler por entre as linhas” quando alguém fala comigo.	Definitivamente concordo	Concordo ligeiramente	Discordo ligeiramente	Definitivamente discordo
28. Costumo concentrar-me mais no todo, e não em pequenos pormenores.	Definitivamente concordo	Concordo ligeiramente	Discordo ligeiramente	Definitivamente discordo
29. Não sou muito bom a lembrar-me de n.ºs de telefone.	Definitivamente concordo	Concordo ligeiramente	Discordo ligeiramente	Definitivamente discordo

30. Não costumo reparar em pequenas alterações numa situação, ou na aparência de uma pessoa.	Definitivamente concordo	Concordo ligeiramente	Discordo ligeiramente	Definitivamente discordo
31. Sei dizer quando é que uma pessoa que me está a ouvir está a ficar aborrecida.	Definitivamente concordo	Concordo ligeiramente	Discordo ligeiramente	Definitivamente discordo
32. Acho fácil fazer mais do que uma coisa ao mesmo tempo.	Definitivamente concordo	Concordo ligeiramente	Discordo ligeiramente	Definitivamente discordo
33. Quando falo ao telefone, não sei muito bem quando é a minha vez de falar.	Definitivamente concordo	Concordo ligeiramente	Discordo ligeiramente	Definitivamente discordo
34. Gosto de fazer as coisas espontaneamente.	Definitivamente concordo	Concordo ligeiramente	Discordo ligeiramente	Definitivamente discordo
35. Sou várias vezes o último a entender uma anedota.	Definitivamente concordo	Concordo ligeiramente	Discordo ligeiramente	Definitivamente discordo
36. Acho fácil perceber o que é que alguém está a pensar ou sentir apenas pela sua cara.	Definitivamente concordo	Concordo ligeiramente	Discordo ligeiramente	Definitivamente discordo
37. Se houver uma interrupção, sou capaz de voltar muito rapidamente ao que estava a fazer.	Definitivamente concordo	Concordo ligeiramente	Discordo ligeiramente	Definitivamente discordo
38. Sou bom em conversas de café.	Definitivamente concordo	Concordo ligeiramente	Discordo ligeiramente	Definitivamente discordo
39. As pessoas dizem-me muitas vezes que eu falo sem parar sobre a mesma coisa.	Definitivamente concordo	Concordo ligeiramente	Discordo ligeiramente	Definitivamente discordo
40. Quando era pequeno, costumava gostar de fazer jogos que envolvessem fingir com outras crianças.	Definitivamente concordo	Concordo ligeiramente	Discordo ligeiramente	Definitivamente discordo
41. Gosto de coleccionar informação sobre categorias de coisas (ex: tipos de carros, tipos de pássaros, tipos de comboios, tipos de plantas, etc.).	Definitivamente concordo	Concordo ligeiramente	Discordo ligeiramente	Definitivamente discordo
42. Acho difícil imaginar como seria ser outra pessoa.	Definitivamente concordo	Concordo ligeiramente	Discordo ligeiramente	Definitivamente discordo
43. Gosto de planear com muito cuidado qualquer actividade em que participe.	Definitivamente concordo	Concordo ligeiramente	Discordo ligeiramente	Definitivamente discordo
44. Gosto de ocasiões sociais.	Definitivamente concordo	Concordo ligeiramente	Discordo ligeiramente	Definitivamente discordo

45. Acho difícil perceber as intenções das pessoas.	Definitivamente concordo	Concordo ligeiramente	Discordo ligeiramente	Definitivamente discordo
46. As situações novas deixam-me ansioso.	Definitivamente concordo	Concordo ligeiramente	Discordo ligeiramente	Definitivamente discordo
47. Gosto de conhecer novas pessoas.	Definitivamente concordo	Concordo ligeiramente	Discordo ligeiramente	Definitivamente discordo
48. Sou um bom diplomata.	Definitivamente concordo	Concordo ligeiramente	Discordo ligeiramente	Definitivamente discordo
49. Não sou muito bom a lembrar-me das datas de nascimento das pessoas.	Definitivamente concordo	Concordo ligeiramente	Discordo ligeiramente	Definitivamente discordo
50. Acho muito fácil fazer jogos que envolvem fingir com as crianças.	Definitivamente concordo	Concordo ligeiramente	Discordo ligeiramente	Definitivamente discordo

Nota: Atribui-se 1 ponto às respostas “Definitivamente concordo” ou “Concordo ligeiramente” nos itens: 1, 2, 4, 5, 6, 7, 9, 12, 13, 16, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 26, 33, 35, 39, 41, 42, 43, 45 e 46. Atribui-se 1 ponto às respostas “Definitivamente discordo” ou “discordo ligeiramente” nos itens: 3, 8, 10, 11, 14, 15, 17, 24, 25, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 34, 36, 37, 38, 40, 44, 47, 48, 49 e 50.

ANEXO F - Carta de aprovação do comitê de ética em pesquisa – CEP UNISUL (nº 3.265.914/CAAE: 04701218.4.0000.5369)



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação de sintomas de transtorno do espectro autista em estudantes de graduação

Pesquisador: Jaime Lin

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 04701218.4.0000.5369

Instituição Proponente: Universidade do Sul de Santa Catarina - UNISUL

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio
Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.265.914

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

ANEXO G - Carta de aprovação do comitê em uso de animais – CEUA UNESC (nº 3.265.914/CAAE: 04701218.4.0000.5369)

Universidade do Extremo Sul Catarinense
Comissão de Ética no Uso de Animais



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto abaixo especificado, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA da Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC, em reunião de **09/03/2021**.

Título do projeto	Avaliação do envolvimento do metabolismo do colesterol um modelo animal de transtorno do espectro autista induzido por ácido valproico*
Project title	<i>Evaluation of the pathophysiological involvement of cholesterol metabolism in an animal model of valproic acid-induced autistic spectrum disorder</i>
Número do protocolo Protocol number	49/2020
Pesquisador principal Principal Investigator	Cinara Ludvíg Gonçalves
Pesquisadores Researchers	Bruna de Andrade Flauzino, Brunna de Moraes, Caroline Pacheco Rodrigues, Jaime Lin, João Victor Folle, Luciana Merten Costa, Maiara de Aguiar da Costa, Maria Goreti Aléssio Crispim, Rosiane Ronchi Nascimento Costa, Tamires da Silva Nascimento, Victória Linden de Rezende, Brunna Bittencourt Netto.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	15/09/2020 a 14/09/2021
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogênico / Wistar
Idade/Peso	60 dias/ 250-300g
Número de animais	21 Masculino e 42 Feminino = 63
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogênico / Wistar
Idade/Peso	1 dia / 30g
Número de animais	80 Masculino e 80 Feminino = 160
Número total	223
Procedência	Biotério UNESC

The Ethics Committee on Animal Use on Research, sanctioned by the resolution number 03/2017/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794/08, has analyzed the Project that was Approved in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes. May you have further questions, please contact us by e-mail ceua@unesc.net.

Josiane Budni
Coordenadora da CEUA

Criciúma-SC, 09 de março de 2021

ANEXO H – Produção científica

Einstein (São Paulo). 2020;18:1-5

einstein

Official Publication of the Instituto Israelita
de Ensino e Pesquisa Albert Einstein

ISSN: 1679-4508 | e-ISSN: 2317-6385

CASE REPORT

Autism associated with 12q
(12q24.31-q24.33) deletion: further
report of an exceedingly rare disorderAutismo associado à síndrome de deleção do
cromossomo 12q24.31-q24.33: relato adicional
de um distúrbio extremamente raroJaime Lin^{1,2}, Gigliolle Romancini de Souza-Lin^{1,3}, Fernanda Coan Antunes¹,
Leticia Burato Wessler⁴, Emilio Luiz Streck⁴, Cinara Ludvig Gonçalves²¹ Universidade do Sul de Santa Catarina, Tubarão, SC, Brazil.² Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, SC, Brazil.³ Hospital Nossa Senhora da Conceição, Tubarão, SC, Brazil.

DOI: 10.31744/einstein_journal/2020RCS335

ABSTRACT

Chromosomal abnormalities are responsible for several congenital malformations in the world, some of these are associated to telomeric/subtelomeric deletions. The abnormalities involving the telomere of chromosome 12 are rare, with few reports of deletions involving 12q24.31 region in the literature, and, to our knowledge, only four of them in the 12q24.31-q24.33 region. We report a further case of interstitial deletion of bands 12q24.31-q24.33 associated with autism spectrum disorder. A 2-year-old boy with global developmental delay associated with multiple congenital anomalies. The Human Genome CGH Microarray 60K confirmed the diagnosis of 12q deletion syndrome. This study made a review of the current literature comparing our patient with previously reported cases. These detailed analyses contribute to the development of genotype/phenotype correlations for 12q deletions that will aid in better diagnosis and prognosis of this deletion.

Keywords: Chromosome aberrations; Nervous system malformations; Developmental disabilities; Autism spectrum disorder; 12q24.31 deletion syndrome

RESUMO

Anomalias cromossômicas são responsáveis por inúmeras malformações congênitas no mundo, algumas delas associadas a deleções teloméricas/subteloméricas. As anomalias que envolvem o telômero do cromossomo 12 são raras, com poucos relatos na literatura sobre deleções relacionados à região 12q24.31 e, até onde sabemos, apenas quatro delas na região 12q24.31-q24.33. Relatamos um outro caso de deleção intersticial das bandas 12q24.31-q24.33 associada ao transtorno do espectro do autismo. Trata-se de um menino de 2 anos de idade com atraso global no desenvolvimento associado a múltiplas anomalias congênitas. A utilização do *Human Genome CGH Microarray 60K* confirmou o diagnóstico da síndrome de deleção 12q. Este estudo fez uma revisão da literatura atual, comparando nosso paciente com casos previamente relatados. Estas análises detalhadas contribuem para o desenvolvimento de correlações genótipo/fenótipo para deleções 12q, que ajudam aos melhores diagnóstico e prognóstico desta deleção.

Descritores: Alterações cromossômicas; Malformações do sistema nervoso; Deficiências do desenvolvimento; Transtorno do espectro autista; Síndrome de deleção 12q24.31

How to cite this article:

Lin J, Souza-Lin GR, Antunes FC, Wessler LB, Streck EL, Gonçalves CL. Autism associated with 12q (12q24.31-q24.33) deletion: further report of an exceedingly rare disorder. *einstein* (São Paulo). 2020; 18: eRCS335. http://dx.doi.org/10.31744/einstein_journal/2020RCS335

Corresponding authors:

Fernanda Coan Antunes
Department of Biology, Medicine
and Social Sciences, Universidade
do Sul de Santa Catarina
Avenida Pedro Zappalini, 1.798 Centro
Zip code: 88701-480 – Tubarão, SC, Brazil
Phone: (55 48) 99906-9929
E-mail: fermandacoan@hotmail.com

Received on:

Aug 18, 2019

Accepted on:

Nov 29, 2019

Copyright 2020



This content is licensed
under a Creative Commons
Attribution 4.0 International License.



Exposure to a high dose of amoxicillin causes behavioral changes and oxidative stress in young zebrafish

Cinara L. Gonçalves¹ · Francine F. P. Vasconcelos¹ · Leticia B. Wessler¹ · Isabela S. Lemos¹ · Gabriela Candiotto¹ · Jaime Lin¹ · Mariane B. D. Matias¹ · Eduardo P. Rico¹ · Emilio L. Streck¹Received: 6 May 2020 / Accepted: 21 August 2020
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2020

Abstract

Autistic spectrum disorder (ASD) is a group of early-onset neurodevelopmental disorders characterized by impaired social and communication skills. Autism is widely described as a behavioral syndrome with multiple etiologies where may exhibit neurobiological, genetic, and psychological deficits. Studies have indicated that long term use of antibiotics can alter the intestinal flora followed by neuroendocrine changes, leading to behavioral changes. Indeed, previous studies demonstrate that a high dose of amoxicillin can change behavioral parameters in murine animal models. The objective was to evaluate behavioral and oxidative stress parameters in zebrafish exposed to a high dose of amoxicillin for 7 days. Young zebrafish were exposed to a daily concentration of amoxicillin (100 mg/L) for 7 days. Subsequently, the behavioral analysis was performed, and the brain content was dissected for the evaluation of oxidative stress parameters. Zebrafish exposed to a high dose of amoxicillin showed locomotor alteration and decreased social interaction behavior. In addition, besides the significant decrease of sulfhydryl content, there was a marked decrease in catalase activity, as well as an increased superoxide dismutase activity in brain tissue. Thus, through the zebrafish model was possible to note a central effect related to the exposition of amoxicillin, the same as observed in murine models. Further, the present data reinforce the relation of the gut-brain-axis and the use of zebrafish as a useful tool to investigate new therapies for autistic traits.

Keywords Autism · Oxidative stress · Amoxicillin · Zebrafish

Introduction

Autism spectrum disorders (ASD) is a neurodevelopmental disorder characterized by impairments in reciprocal social interaction, communication, and repetitive and restricted behaviors and interests (DSM-IV) comprising a heterogeneous and complex group of pathological conditions (Kumar et al. 2012). Epidemiological studies show that autism and generalized developmental disorders collectively referred to as ASD is more common than previously thought. A very recent study showed that the current prevalence is about 1 in 54 children in the USA (Maenner et al. 2020; Baird et al. 2006). ASD is diagnosed based on the patient's clinical history and is defined

by behavior-related symptoms such as communication deficits, irritability, difficulties in social interaction such as emotional reciprocity, repetitive behaviors, stereotyped patterns, and restricted interests, including adherence inflexible to a specific routine, obsessive interests, dysfunction in the ability to process complex verbal and visual information, but have associative learning ability and verbal working memory (American Psychiatric Association 2013).

Besides the increasing prevalence, it is still unclear what is behind the scenes of the pathophysiology of ASD. Postmortem studies show some commonly affected areas in the brain of individuals with ASD presenting rapid cell death when under oxidative stress (López-Hurtado and Prieto, 2008). In fact, there was an increase in plasma lipid peroxidation in children with autism compared to non-autistic siblings (Chauhan et al. 2004). The plasma levels of nitrite and nitrate, another toxic free radical, were also increased in autistic patients, as reported by Zoroglu et al. (2003) and Sweeten et al. (2004). Additionally, biochemical, anatomical, and neuroradiographical studies have suggested a disturbance of

✉ Emilio L. Streck
emiliostreck@gmail.com

¹ Laboratório de Neurologia Experimental, Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, SC 88806-000, Brazil

A importância da investigação genética em casos de transtornos do espectro do autismo: relato de Síndrome de Phelan-Mcdermid

The importance of genetic research in cases of autism spectrum disorders: report of Phelan-Mcdermid Syndrome

Jaime Lin¹, Gigliolle Romancini de Souza-Lin², Maria Eduarda Angelo de Mendonça Fileti³, Tais Luise Denicol⁴
Letícia Burnto Wessler⁵, Emílio Luiz Streck⁶

RESUMO

O transtorno do espectro autista (TEA) é uma condição neuropsiquiátrica grave caracterizada por comprometimento na comunicação e interação social, bem como interesses restritos e repetitivos. Diversos estudos têm demonstrado papel significativo da herança genética nos quadros de TEA. Atualmente, através de investigação genética, estima-se que em cerca de 25% dos casos uma potencial etiologia genética pode ser identificada. Acredita-se que, combinando-se dados clínicos, avaliação dos fatores de risco existentes e dados de investigação complementar, uma explicação etiológica pode ser encontrada em torno de 30 a 40% dos casos. Relatamos o caso de paciente com transtorno do espectro autista no qual a investigação genética revelou Síndrome de Phelan-Mcdermid. A síndrome da deleção 22q13.3 (Síndrome de Phelan-Mcdermid) é resultado da perda de porções distais do braço longo do cromossomo 22. A perda do material genético pode resultar de uma deleção terminal ou intersticial do cromossomo 22, translocação não balanceada que pode ser herdada ou mutação de novo, ou resultar de rearranjos estruturais envolvendo o cromossomo 22. Aspectos clínicos incluem hipotonia neonatal, comprometimento intelectual moderado ou grave e ausência ou atraso importante na linguagem expressiva. Aspectos fenotípicos incluem dolicocefalia, anormalidades faciais, ponte nasal larga, olhos profundos, cílios alongados e nariz bulboso. Mãos alargadas, unhas displásicas, defeitos sacrais, orelhas amplas e malformadas são frequentemente observadas. Evidencia-se o comportamento compatível com TEA caracterizado por comprometimento na comunicação, interação social reduzida, pobreza de contato visual e ansiedade. Aconselha-se investigação genética em todos os casos de TEA, especialmente quando associada a aspectos fenotípicos dismórficos.

UNITERMOS: Síndrome de Phelan-McDerimid, síndrome de deleção 22q13, transtorno do espectro autista, investigação genética, SHANK3

ABSTRACT

Autism spectrum disorder (ASD) is a serious neuropsychiatric condition characterized by impaired communication and social interaction, as well as restricted and repetitive interests. Several studies have demonstrated a significant role for genetic inheritance in ASD conditions. Currently, through genetic investigation, it is estimated that in about 25% of cases a potential genetic etiology can be identified. It is believed that by combining clinical data, assessment of existing risk factors, and data from further investigation, an etiological explanation can be found in about 30-40% of cases. Here we report the case of a patient with autism spectrum disorder in which genetic investigation revealed Phelan-Mcdermid syndrome. The 22q13.3 deletion syndrome (Phelan-Mcdermid syndrome) results from the loss of distal portions of the long arm of chromosome 22. The loss of genetic material may result from a terminal or interstitial deletion of

¹ Médico Neuropediatra – Departamento de Biologia, Saúde e Ciências Sociais – Universidade do Sul de Santa Catarina (Unisul) – Tubarão /SC. (M.Sc. Médico Neuropediatra – Departamento de Biologia, Saúde e Ciências Sociais – Unisul – Tubarão /SC.)

² Médica Residente em Medicina de Família e Comunidade – Hospital Nossa Senhora da Conceição – Unisul – Tubarão /SC.

³ Estudante de Medicina da Unisul. Tubarão /SC (Acadêmica do Curso de Medicina – Unisul – Tubarão /SC)

⁴ Estudante de Medicina da Unisul – Tubarão /SC (Acadêmica do Curso de Medicina – Unisul – Tubarão /SC)

⁵ Mestre (Laboratório de neurologia experimental – Departamento de Ciências da Saúde – Universidade do Extremo Sul Catarinense – Criciúma/SC)

⁶ Ph.D. (Laboratório de neurologia experimental – Departamento de Ciências da Saúde – Universidade do Extremo Sul Catarinense – Criciúma/SC)



Review

Sex-related patterns of the gut-microbiota-brain axis in the neuropsychiatric conditions

Luana M. Manosso^a, Jaime Lin^b, Anelise S. Carlessi^a, Kelen C.C. Recco^a, João Quevedo^{a,c,d,e}, Cinara L. Gonçalves^b, Gislaïne Z. Réus^{a,*}

^a Translational Psychiatry Laboratory, Graduate Program in Health Sciences, University of Southern Santa Catarina (UNESC), Criciúma, SC, Brazil

^b Experimental Neurology Laboratory, Graduate Program in Health Sciences, Health Sciences Unit, University of Southern Santa Catarina, Criciúma, SC, Brazil

^c Translational Psychiatry Program, Fallace Department of Psychiatry and Behavioral Sciences, McGovern Medical School, The University of Texas Health Science Center at Houston (UTHealth), Houston, TX, USA

^d Center of Excellence on Mood Disorders, Fallace Department of Psychiatry and Behavioral Sciences, McGovern Medical School, The University of Texas Health Science Center at Houston (UTHealth), Houston, TX, USA

^e Neuroscience Graduate Program, The University of Texas MD Anderson Cancer Center UTHealth Graduate School of Biomedical Sciences, Houston, TX, USA

ARTICLE INFO

Keywords:

Sex difference
Gut-microbiota-brain axis
Autism spectrum disorder
Major depressive disorder
Schizophrenia

ABSTRACT

Sex differences are often observed in psychiatric patients, especially major depressive disorders (MDD), schizophrenia, and developmental disorders, including autism spectrum disorders (ASDs). The prevalence rates between males and females seem to vary according to the clinical condition. Although the findings are still incipient, it is suggested that these differences can involve neuroanatomical, neurochemical, and physiological sex differences. In this context, the microbiota-gut-brain axis hypothesis arises to explain some aspects of the complex pathophysiology of neuropsychiatric disorders. The microbiota composition is host-specific and can change conforming to age, sex, diet, medication, exercise, and others. The communication between the brain and the gut is bidirectional and may impact the entire system homeostasis. Many pathways appear to be involved, including neuroanatomic communication, neuroendocrine pathways, immune system, bacteria-derived metabolites, hormones, neurotransmitters, and neurotrophic factors. Although the clinical and preclinical studies are sparse and not very consistent, they suggest that sex differences in the gut microbiota may play an essential role in some neuropsychiatric conditions. Thus, this narrative review has as a main aim to show the points sex-related patterns associated to the gut-microbiota-brain axis in the MDD, ASDs, and schizophrenia.

1. Introduction

Neuropsychiatric conditions are included in mental disorders characterized by some combination of abnormal emotions, behavior, thoughts, and relationships with others (WHO, 2020a). The burden of mental disorders is growing with impacts on health, quality of life of individuals and families, and economic consequences around the world. Furthermore, stigma and discrimination are prevalent among individuals with neuropsychiatric conditions (Bipeta et al., 2020; Kaushik et al., 2016; Kinson et al., 2018). Some examples of mental disorders are major depressive disorders (MDD), schizophrenia, and developmental disorders including autism spectrum disorders (ASDs) (WHO, 2019).

Notably, sex differences are observed in these disorders. While MDD is more prevalent in women (two times higher in females than in males post-puberty); ASDs and schizophrenia are more prevalent in men (four to five times higher in males, and 1.42 times higher in males than in females, respectively) (McCarthy et al., 2017). Although the findings are still incipient, it is suggested that these differences can involve neuroanatomical, neurochemical, and physiological sex differences (Choleris et al., 2018; McCarthy et al., 2017).

The pathophysiology of neuropsychiatric disorders is complex and heterogeneous; a growing body of evidence has suggested the importance of the microbiota-gut-brain axis (Cryan et al., 2019; Dinan and Cryan, 2017a; Foster and McVey Neufeld, 2013). Microbiota is defined

Abbreviations: 5HT_{1A}, serotonin receptor 1A; ASDs, autism spectrum disorders (ASDs); BDI, Beck depression inventory; BDNF, brain-derived neurotrophic factor; GABA, γ -aminobutyric acid; LPS, lipopolysaccharide; HPA, hypothalamic-pituitary-adrenal axis; MDD, major depressive disorders (MDD); OTUs, operational taxonomic units; TNF, α - tumor necrosis factor- α .

* Corresponding author at: Translational Psychiatry Laboratory, University of Southern Santa Catarina, Criciúma, SC, 88806-000, Brazil.

E-mail address: gislaïne.reus@unesc.net (G.Z. Réus).

<https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2021.04.001>

Received 17 February 2021; Received in revised form 30 March 2021; Accepted 2 April 2021

Available online 7 April 2021

0361-9230/© 2021 Elsevier Inc. All rights reserved.

Encefalopatia epiléptica e autismo: relato de caso de Síndrome de Dravet e reflexões acerca do diagnóstico

Epileptic encephalopathy and autism: case report of Dravet Syndrome and reflections on the diagnosis

Jaime Lin¹, Bruna de Andrade Flauzino², Emilio Luiz Streck³, Cinara Ludvig Gonçalves⁴

RESUMO

A relação entre autismo e epilepsia tem sido alvo de crescente interesse, especialmente no diagnóstico de síndromes raras. Neste sentido, este trabalho relata um caso de encefalopatia epiléptica associada a sintomas clínicos compatíveis com transtorno do espectro autista (TEA), cuja investigação neurogenética revelou tratar-se de um caso de Síndrome de Dravet. Trata-se de um paciente masculino, 6 anos de idade, que apresentou atraso no desenvolvimento neurológico juntamente com crises epiléticas frequentes. Na história familiar, o pai apresenta sintomas clínicos compatíveis com TEA, e, segundo a mãe, não houve história de intercorrências na gestação. O paciente apresentou desenvolvimento neurológico adequado até os 8 meses de idade, quando apresentou o primeiro episódio de crise epilética. Ao exame físico, aos 6 anos de idade, o paciente apresentava ausência de linguagem verbal e não verbal, dificuldades na interação social, pobre contato visual, presença de estereotípias e crises de temperamento. Aplicando-se o questionário CARS (*Childhood Autism Rating Scale*), obteve-se o resultado compatível com autismo grave. No desenvolvimento cognitivo, os pacientes com Síndrome de Dravet exibem um padrão característico que mostra uma interrupção ou um atraso no desenvolvimento neurológico seguido por alterações comportamentais, hiperatividade e quadro clínico compatível com TEA.

UNITERMOS: Síndrome de Dravet, transtorno do espectro autista, epilepsia

ABSTRACT

The relationship between autism and epilepsy has been the target of growing interest, especially in the diagnosis of rare syndromes. In this sense, this paper reports a case of epileptic encephalopathy associated with clinical symptoms compatible with autism spectrum disorder (ASD), whose neurogenetic investigation revealed to be a case of Dravet Syndrome. This is a 6-year-old male patient who presented neurological development delay along with frequent epileptic seizures. In the family history, the father presents clinical symptoms compatible with ASD, and according to the mother, there was no history of complications during pregnancy. The patient had adequate neurological development until 8 months of age, when he had the first episode of epileptic seizures. On physical examination, at 6 years of age, the patient presented absence of verbal and non-verbal language, difficulties in social interaction, poor visual contact, presence of stereotypies and temper outbursts. By applying the CARS (Childhood Autism Rating Scale) questionnaire we obtained a result compatible with severe autism. In cognitive development, patients with Dravet Syndrome exhibit a characteristic pattern that shows an interruption or delay in neurological development followed by behavioral changes, hyperactivity and clinical picture compatible with ASD.

KEYWORDS: Dravet Syndrome, autistic spectrum disorder, epilepsy

¹ Mestrado em Neurologia/Neurociências (Professor de Neuropediatria, doutorando no Laboratório de Neurologia Experimental, Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense)

² Acadêmica em Odontologia (Estudante de Iniciação Científica no Laboratório de Pesquisa em Autismo e Transtornos do Neurodesenvolvimento, Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense)

³ Doutor em Bioquímica (Professor Pesquisador no Laboratório de Neurologia Experimental, Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense)

⁴ Doutora em Bioquímica (Professora Pesquisadora no Laboratório de Pesquisa em Autismo e Transtornos do Neurodesenvolvimento, Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense)