

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

**ESTUDO EXPERIMENTAL DE SÉRIE DE CASOS
COM O USO DO PEPTÍDEO LIBERADOR DE
GASTRINA EM PACIENTES PEDIÁTRICOS COM
DIAGNÓSTICO DE AUTISMO**

TESE DE DOUTORADO

MICHELE MICHELIN BECKER

Porto Alegre, Brasil

2013

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

**ESTUDO EXPERIMENTAL DE SÉRIE DE CASOS
COM O USO DO PEPTÍDEO LIBERADOR DE
GASTRINA EM PACIENTES PEDIÁTRICOS COM
DIAGNÓSTICO DE AUTISMO**

MICHELE MICHELIN BECKER

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

Orientador: Prof. Dr. Rudimar dos Santos Riesgo

Co-orientador: Prof. Dr. Gilberto Schwartzmann

Porto Alegre, Brasil

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

B395e Becker, Michele Michelin

Estudo experimental de série de casos com o uso do peptídeo liberador de gastrina em pacientes pediátricos com diagnóstico de autismo / Michele Michelin Becker; orientador Rudimar dos Santos Riesgo – Porto Alegre, 2013.
143 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do sul, Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, Porto Alegre, 2013.

1. Autismo 2. Peptídeo liberador de gastrina 3. Estudo experimental I. Riesgo, Rudimar dos Santos II. Título

CDD 618.928982

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

ESTA DISSERTAÇÃO FOI DEFENDIDA PUBLICAMENTE EM:

16 / 12 / 2013

E, FOI AVALIADA PELA BANCA EXAMINADORA COMPOSTA POR:

Prof.Dr. Paulo Roberto Antonacci Carvalho
PPG Saúde da Criança e do Adolescente
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof.Dr. Cléber Ribeiro Álvares da Silva
Departamento de Clínica Médica
Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Dra. Maria Isabel Bragatti
Unidade de Neurologia Infantil
Hospital de Clínicas de Alegre

*Para minha filha Marina, por
alegrar a minha vida a todo
instante e me mostrar o significado
mais puro da palavra AMOR.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Rudimar Riesgo, por ter sido meu grande incentivador em passos importantes da minha vida, como o mestrado, o doutorado e outras conquistas. Sempre amigo, compreensível e companheiro. Sou muito grata por seus conselhos, seus ensinamentos.

Ao meu co-orientador Prof. Gilberto Schwartzmann, pelo grande entusiasmo que transmite a cada descoberta, pela capacidade de minimizar empecilhos e de sempre enxergar além, lá longe, como somente conseguem as pessoas realmente especiais. Agradeço pela gentileza e respeito que sempre teve comigo e pelos ensinamentos de vida que me passou, como por exemplo, respeitar os pacientes e a vida, em primeiro lugar.

A Prof.^a Cleonice Bosa, as psicólogas Renata Giuliani Endres, Simone Lampert Steyer, Regina Basso Zanon, Bárbara Backes, Maíra Ainhoren Meimes e Gabriela Romeira pelo belo trabalho que fizeram, por terem ajudado de forma imprescindível nesta pesquisa, sempre tão responsáveis, amigas e companheiras.

Ao Dr. José Roberto Goldim, por seus ensinamentos e conselhos, sempre providos de grandes conhecimentos.

A secretária do Serviço de Oncologia Infantil do HCPA, Rosana Rodrigues, pelo carinho com que sempre me tratou e pelas inúmeras vezes que me ajudou, sempre prestativa e amiga.

Ao Prof. Paulo Carvalho, por quem tenho grande carinho, por suas palavras incentivadoras e amigas e seus conselhos, sempre muito pertinentes.

A colega e amiga Clarissa Carvalho, pelo carinho que teve comigo, pela amizade e pela valiosa ajuda na reta final deste trabalho.

As minhas colegas Dra. Lygia Ohlweiler, Dra. Maria Isabel Bragatti e Dra. Josiane Ranzan, meu imenso carinho, amizade e gratidão, por terem sido tão compreensivas e “colegas” no melhor sentido desta palavra, durante esses três anos. Agradeço por toda a ajuda que me deram, por terem sido tão compreensivas nos momentos em que estive ausente, pelas palavras amigas e de força nos momentos em que eu era tomada pelo cansaço ou pelo pessimismo...

Aos meus pais Ivo e Eloiva e a minha irmã Ana Lúcia, por serem grandes incentivadores e por sempre me darem tanto apoio e “amor”, sentimento muito importante em todos os momentos da vida, principalmente quando passamos por desafios.

Ao meu marido Tiago, a quem me faltam palavras para agradecer. Agradeço por tê-lo sempre comigo, pelo seu carinho, por seus conselhos sempre tão sábios e equilibrados, pela ajuda com o trabalho do doutorado, mas principalmente, por sonhar os sonhos junto comigo, sempre me incentivando a crescer e a jamais “parar”.

A minha filha Marininha, por todo o carinho e amor que recebo, e pelas novas descobertas que me proporciona a cada dia. Quando diz que quer ser igual a mim, não imagina a força e o entusiasmo que me transmite, fazendo com que eu busque novos desafios, quebre limites e tente ser alguém cada vez melhor.

As famílias que aceitaram participar do estudo, com quem me emocionei, aprendi muito sobre o amor entre pais e filhos, amor este incondicional e incansável. Agradeço por não terem medido esforços para tornar esse desafio e essa esperança possível.

AUTISMO

“Não há palavras no dicionário deles,

Mas a linguagem universal do amor também não é verbal.

Para se expressar através dela há gestos e expressão corporal.

Também há a vibração sutil e invisível da emoção, da solidariedade, da paciência, da

aceitação da pessoa como ela é e não como queremos que ela seja.

É de se presumir que estejam fazendo tudo o que lhes seja possível, dentro das suas

limitações.

Com um pouco de boa vontade de nossa parte,

Talvez concordem em tocar a mão que estamos oferecendo,

A fim de saltarem o abismo que nos separa...”

Schwartzmann, 1995.

RESUMO

Introdução: O autismo é uma desordem neurocomportamental complexa, de forte base genética e multifatorial, com vários fatores de risco já identificados. Apesar dos avanços no seu entendimento e no diagnóstico precoce, ainda não se conhece um tratamento capaz de reverter completamente os seus sintomas. Estudos indicam que o peptídeo liberador de gastrina (GRP) atua no sistema nervoso central (SNC) regulando os comportamentos relacionados à resposta emocional, interação social, memória e alimentação. Pesquisas em animais mostraram que o bloqueio dos receptores do GRP (GRPR) durante o período neonatal leva a alterações comportamentais compatíveis com o transtorno do espectro autista, como diminuição da interação social e do apego, e suportam a possibilidade de que uma expressão ou um funcionamento anormal dos GRPR durante o desenvolvimento possa ter um papel na patogênese desse transtorno. **Objetivo:** Avaliar possíveis efeitos terapêuticos nos sintomas do espectro autista com a administração de GRP a crianças e adolescentes com diagnóstico de autismo infantil, assim como sua segurança e tolerabilidade. **Metodologia:** Inicialmente foi realizado um estudo piloto com a administração de GRP 160 picomol/kg, por 4 dias consecutivos, a três crianças com autismo infantil. Nesse estudo utilizou-se como método de avaliação a impressão dos pais, as escalas *Clinical Global Impressions-Improvement* (CGI-I) e *Childhood Autism Rating Scale* (CARS). Após, realizou-se um ensaio clínico aberto, com uso de GRP 160 picomol/kg, por 4 dias consecutivos, em dez crianças e adolescentes com autismo. Os desfechos foram medidos através das escalas CGI-I, CARS, *Aberrant Behavior Checklist* (ABC) e *Autism Diagnostic Interview-Revised* (ADI-R). Foi considerada melhora com GRP valores de 1 (muito melhor) ou 2 (melhor) na CGI-I e melhora $\geq 25\%$ em pelo menos uma das subescalas da ABC. **Resultados:** No estudo piloto foram encontradas melhoras variáveis nos principais sintomas do espectro autista nas três crianças, como interação social, linguagem verbal, estereotipias e compulsões, além de sintomas associados à irritabilidade. Nenhuma criança apresentou efeitos adversos e o GRP foi bem tolerado. No ensaio clínico, a idade dos participantes variou de 5 a 16 anos (mediana 8). Seis (60%) das 10 crianças tiveram melhora com GRP. Pela escala ABC, 8 (80%) tiveram melhora nas subescalas Irritabilidade e Hiperatividade, 7 (70%) nas subescalas Comportamento estereotipado e Letargia e esquiva social e 4 (40%) na subescala Fala inapropriada. Na CARS, houve uma diminuição média de 4 pontos ($4,3 \pm 2,9$) e na ADI-R houve melhora significativa no domínio de interação social recíproca ($2,4 \pm 2,83$). Efeitos adversos ocorreram em três pacientes e foram náuseas (2/10), vômitos (2/10), diarreia (2/10) e *rash* cutâneo (1/10). Todos os pacientes completaram o estudo. **Conclusões:** Os resultados desses estudos sugerem que o GRP seja seguro, bem tolerado e que possa melhorar sintomas chaves do autismo infantil para os quais ainda não há nenhum tratamento medicamentoso específico. Estudos maiores, randomizados, duplo-cegos e controlados por placebo são necessários para que se possa avaliar de forma mais efetiva a segurança e a eficácia do GRP em crianças e adolescentes autistas.

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

ABSTRACT

Introduction: Autism is a complex neurodevelopmental disorder, of strong genetic basis and multifactorial, with many risk factors already identified. Despite advances in its understanding and in the early diagnosis, is not yet known a treatment able to completely reverse its symptoms. Studies indicate that the gastrin-releasing peptide (GRP) acts in the central nervous system (CNS) regulating the behaviors related to emotional response, social interaction, memory and feeding. Researches on animals showed that the blocking of the GRP receptors (GRPR) during the neonatal period leads to behavioral alterations consistent with the disorder of autistic spectrum, such as social interaction and clinging decrease, and support the possibility that abnormal GRPR expression or function during the development may play a role in the pathogenesis of this disorder. **Objective:** To evaluate the possible therapeutic effects on the symptoms of the autistic spectrum with the administration of GRP for children and adolescents diagnosed with infantile autism, as well as its safety and tolerability. **Methodology:** Initially a pilot study was conducted with the administration of GRP160 picomol/kg for 4 consecutive days, to three children with infantile autism. In this study as a method of evaluating the impression of parents, it was used the *Clinical Global Impressions - Improvement* (CGI - I) and *Childhood Autism Rating Scales* (CARS) scales. After, it was performed an open clinical trial, using GRP160 picomol/kg for 4 consecutive days, in ten children and adolescents with autism. Outcomes were measured by the CGI -I, CARS, *Aberrant Behavior Checklist* (ABC), and *Autism Diagnostic Interview -Revised* (ADI -R) scales. It was found an improvement with GRP: values of 1 (very much improved) or 2 (much improved) in the CGI and ≥ 25 % improvement in at least one of the subscales of the ABC. **Results:** In the pilot study variable improvements were found in the key symptoms of autistic spectrum in three children as social interaction, verbal language, stereotypes and compulsions, apart from symptoms associated with irritability. No child presented adverse effects and the GRP was well tolerated. In the clinical trial, the participants' age ranged from 5 to 16 years (average 8). Six (60 %) of the 10 children showed improvement with GRP. By the ABC scale, 8 (80 %) improved in the Irritability and Hyperactivity subscales, 7 (70 %) in the subscales of stereotyped Behavior and Lethargy and social avoidance and 4 (40 %) in the subscale inappropriate Speech. In CARS, there was an average decrease of 4 points (4.3 ± 2.9) and in the ADI -R there was a significant improvement in the field of reciprocal social interaction (2.83 ± 2.4). Adverse effects were observed in three patients, and were nausea (2/10), vomiting (2/10), diarrhea (2/ 10) and skin *rash* (1/ 10). All patients completed the study. **Conclusions:** The results of these studies suggest that the GRP is safe, well tolerated and may improve key symptoms of infantile autism for which there is still no specific drug treatment. Larger studies, randomized, double-blind, placebo-controlled are needed to be able to assess more effectively the safety and efficacy of GRP in autistic children and adolescents.

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

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Imagem de ressonância magnética funcional utilizada para estudar ativação da amígdala, do giro fusiforme e do sulco temporal superior (STS) em resposta a percepção de faces..... 48
- Figura 2 - Estrutura molecular do GRPR..... 67
- Figura 3 - Alterações comportamentais permanentes em ratos obtidas pelo bloqueio do GRPR no período de desenvolvimento do SNC..... 74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sintomas do autismo do nascimento aos 2 anos de idade	40
Tabela 2 - Patologias associadas ao autismo.....	42
Tabela 3- Áreas cerebrais envolvidas em redes neuronais possivelmente associadas com autismo	49
Tabela 4 - Exemplos e aplicações de peptídeos e proteínas em uso clínico ou em fase de desenvolvimento.....	58
Tabela 5 - Vantagens e desvantagens do tratamento com peptídeos.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAGF	Autismo de Alto Grau de Funcionamento
ABA	<i>Applied Behavior Analysis</i>
ABC	<i>Aberrant Behavior Checklist</i>
ACTH	Hormônio Adrenocorticotrófico
ADI-R	<i>Autism Diagnostic Interview-Revised</i>
ADOS	<i>Autism Diagnostic Observation Schedule</i>
AS	Síndrome de Asperger
ASQ	<i>Autism Screening Questionary</i>
ATA	<i>Scale of Autistic Traits</i>
BB	Peptídeo bombesina
BHE	Barreira hemato-encefálica
CARS	<i>Childhood Autism Rating Scale</i>
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CGI-I	<i>Clinical Global Impression- Improvement Scale</i>
CGI-S	<i>Clinical Global Impression- Severity Scale</i>
CHAT	<i>Cheklist for Autism in Toddlers</i>
CID 10	Classificação Estatística Internacional de Doenças e Problemas Relacionados à Saúde
CNV	Variação de número de cópias
CPC	Centro de Pesquisas Clínicas
DSM-5	<i>Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition</i>
DSM-III	<i>Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Third Edition</i>
DSM-III-R	<i>Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Third Edition- Revised</i>
DSM-IV	<i>Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Edition</i>
DSM-IV-TR	<i>Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Edition- Text Revised</i>
ESAT	<i>Early Screening for Autistic Traits</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GARS	<i>The Giliam Autism Rating Scale</i>
GnRh	Hormônio liberador de gonadotrofina
GRP	Peptídeo liberador de gastrina

GRPR	Receptor do peptídeo liberador de gastrina
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
ITC	<i>The Infant Toddler Checklist</i>
M-CHAT	<i>Modified Checklist for Autism in Toddlers</i>
PDDST	<i>Pervasive Developmental Disorders Screening Test</i>
PECS	<i>Picture Exchange Communication System</i>
PET	Tomografia com emissão de pósitrons
QI	Quociente de Inteligência
SCQ	<i>The Social Communication Questionnaire</i>
SNC	Sistema nervoso central
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
STS	Sulco temporal superior
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TDAH	Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade
TEA	Transtorno do Espectro Autista
TEACCH	<i>Treatment and Educational of Autistic and Related Communication-Handicapped Children</i>
TGI	Trato gastrointestinal
TID	Transtorno Invasivo do Desenvolvimento
TID-NE	Transtorno Invasivo do Desenvolvimento Não-Especificado
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1	AUTISMO	19
2.1.1	Aspectos históricos	19
2.1.2	Aspectos epidemiológicos	23
2.1.3	Manifestações clínicas	26
2.1.3.1	Déficits de Interação Social	27
2.1.3.2	Déficit de comunicação	29
2.1.3.3	Padrões restritos e repetitivos de comportamento, interesses e atividades.....	30
2.1.3.4	Sintomas secundários ou comórbidos	32
2.1.4	Diagnóstico	35
2.1.4.1	Critérios diagnósticos	35
2.1.4.2	Instrumentos Diagnósticos.....	36
2.1.4.3	Diagnóstico precoce	37
2.1.5	Etiologia	42
2.1.6	Neurobiologia	44
2.1.7	Tratamento	51
2.1.7.1	Tratamento medicamentoso.....	51
2.1.7.2	Tratamento não medicamentoso	54
2.1.8	Prognóstico	55
2.2	PEPTÍDEOS	56
2.2.1	Considerações Gerais	56
2.2.2	Aplicações Terapêuticas	56
2.2.3	Peptídeos e o SNC	60
2.2.3.1	Neurotensina	61
2.2.3.2	Colecistoquinina.....	61
2.2.3.3	Neuropeptídeo Y	62
2.2.3.4	Amilina	62
2.2.3.5	Neurotrofinas	63
2.2.3.6	Secretina	63
2.2.3.7	Oxitocina e vasopressina	64
2.2.4	Peptídeo liberador de gastrina	66

2.2.4.1	Ações do GRP nos tecidos periféricos	68
2.2.4.2	Ações do GRP no sistema nervoso central	69
2.2.4.3	GRP e autismo	73
2.2.4.4	Estudos clínicos com GRP.....	75
3	ESTUDO PILOTO	76
4	JUSTIFICATIVA	77
5	OBJETIVOS.....	79
5.1	OBJETIVO GERAL.....	79
5.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	79
6	METODOLOGIA	80
6.1	DELINEAMENTO DO ESTUDO.....	80
6.2	AMOSTRA	80
6.2.1	Critérios de Inclusão	80
6.2.2	Critérios de Exclusão	81
6.3	INTERVENÇÃO	81
6.4	VARIÁVEIS EM ESTUDO	81
6.5	DESFECHO ESPERADO.....	82
6.6	FERRAMENTAS DE PESQUISA	82
6.6.1	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Edition, Text Revised (DSM-IV-TR)	82
6.6.2	Autism Diagnostic Interview-Revised (ADI-R)	83
6.6.3	Childhood Autism Rating Scale (CARS).....	83
6.6.4	Aberrant Behavior Checklist (ABC)	84
6.6.5	Clinical Global Impression (CGI).....	84
6.7	LOCAL DE REALIZAÇÃO	85
6.8	LOGÍSTICA	85
7	ASPECTOS ESTATÍSTICOS	87
7.1	CÁLCULO DO TAMANHO DA AMOSTRA	87
7.2	ANÁLISE DOS RESULTADOS.....	87
8	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	88
9	REFERÊNCIAS	90
10	ARTIGO 1 – ESTUDO EXPERIMENTAL DE TRÊS CASOS COM O USO DO PEPTÍDEO LIBERADOR DE GASTRINA EM PACIENTES PEDIÁTRICOS COM DIAGNÓSTICO DE AUTISMO	101

11	ARTIGO 2 - ESTUDO EXPERIMENTAL DE SÉRIE DE CASOS COM O USO DO PEPTÍDEO LIBERADOR DE GASTRINA EM PACIENTES PEDIÁTRICOS COM DIAGNÓSTICO DE AUTISMO	117
12	CONSIDERAÇÕES FINAIS	137
	APÊNDICE A - CRITÉRIOS PARA DIAGNÓSTICO DE TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA PELO DSM-5.....	139
	APÊNDICE B - CRITÉRIOS PARA DIAGNÓSTICO DE AUTISMO CLÁSSICO PELO DSM-IV-TR.....	140
	APÊNDICE C - TERMO DE ESCLARECIMENTO PARA VOLUNTÁRIOS	141
	APÊNDICE D - FICHA DE IDENTIFICAÇÃO DE VOLUNTÁRIOS	142
	APÊNDICE E - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	143
	APÊNDICE F - TABELA DOS SINTOMAS DO ESPECTRO AUTISTA PARA OS PAIS OU RESPONSÁVEIS.....	145

1 INTRODUÇÃO

Desde que Leo Kanner originalmente descreveu o autismo (KANNER, 1942), há 70 anos, a condição médica e sociocultural do autismo mudou grandemente, e continua a mudar. A sua definição, inicialmente “distúrbio autístico do contato afetivo” sofreu muitas mudanças e, atualmente, refere-se a um grupo heterogêneo de desordens, denominado de “Transtorno do Espectro Autista” (TEA). Essas desordens têm em comum os achados de prejuízo na interação social, na comunicação e na linguagem, e maneirismos motores estereotipados e/ou repertório restrito de interesses (DUCHAN e PATEL, 2012). O termo “espectro” deve-se a grande variação quanto ao tipo e a severidade dos sintomas autistas presentes em cada indivíduo.

Graças ao aumento explosivo no número de pesquisas e publicações no assunto (AMARAL, 2011), várias teorias sobre o autismo mudaram nesses anos. Hoje se sabe que ele é uma doença orgânica, de base genética e multifatorial, e fatores de risco para o transtorno já foram identificados (BETANCUR, 2010 e OLIVIÉ, 2012). Sabe-se também que intervenções precoces são muito importantes para o prognóstico (WARREN *et al.*, 2011), principalmente terapias comportamentais (LEBLANC e GILLIS, 2012). Apesar de todos esses avanços, o autismo infantil ainda é um transtorno que desafia e intriga neurologistas e psiquiatras infantis, já que sua etiologia exata permanece desconhecida, não há um marcador biológico identificado (SELDAS, 2012) e não há uma explicação concreta para a grande heterogeneidade de sintomas encontrados entre os indivíduos afetados (MYERS e JOHNSON, 2007).

O uso de medicamentos em crianças com autismo é comum, e estima-se que mais de 45% das crianças com TEA sejam tratadas com medicações psicotrópicas (ROSSIGNOL, 2009). Infelizmente, até o momento, não há um tratamento específico para o transtorno ou que seja capaz de reverter completamente seus sintomas (BENVENUTO *et al.*, 2013). Isso faz

com que muitas famílias utilizem tratamentos não convencionais, sem efetividade comprovada, muitas vezes sem conhecimento dos médicos, o que pode ser tão comum quanto 3 em cada 4 pacientes (ROSSIGNOL, 2009).

Além de todos os desgastes físicos e emocionais vivenciados pelas famílias com indivíduos autistas, há também uma enorme sobrecarga financeira. Estima-se que para cada criança com autismo se gaste aproximadamente US\$3,2 milhões ou US\$35 bilhões com todos os indivíduos diagnosticados com autismo em um ano, ao longo de suas vidas (GANZ, 2007).

Nas últimas décadas, a descoberta de que peptídeos podem atuar no sistema nervoso central (SNC) como neurotransmissores (MALATOVA e CABRAL, 2011) fez com que surgisse o interesse em estudar as ações dos diversos neuropeptídeos e suas possíveis aplicações terapêuticas em doenças psiquiátricas, neurodegenerativas e do desenvolvimento (ROESLER e SCHWARTSMANN, 2012). As pesquisas com neuropeptídeos no autismo iniciaram na década de 90 com a secretina (WÓJCIAK *et al.*, 2012). Atualmente estuda-se a oxitocina, com resultados promissores (HOLLANDER *et al.*, 2003; HOLLANDER *et al.*, 2007).

Os receptores do peptídeo liberador de gastrina (GRPR) têm sido implicados em doenças do SNC, incluindo transtornos do neurodesenvolvimento. Estudos sugerem que o bloqueio dos GRPR durante o desenvolvimento pode levar a alterações comportamentais compatíveis com TEA, e suportam a possibilidade de que uma expressão ou um funcionamento anormal dos GRPR nesse período possa ter um papel na patogênese dessa doença (ROESLER e SCHWARTSMANN, 2012).

Nesse estudo foi administrado peptídeo liberador de gastrina (GRP) endovenoso a crianças com autismo infantil para avaliação de possíveis efeitos terapêuticos nos sintomas do espectro autista, além da sua tolerabilidade e segurança.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 AUTISMO

2.1.1 Aspectos históricos

A expressão “autismo” foi primeiramente utilizada por Eugen Bleurer, em 1911, para designar perda de contato com a realidade, com conduta intencional de evitar relacionamentos sociais. Bleurer utilizou o termo para se referir à vida de fantasia dos pacientes esquizofrênicos (RIVERA, 2007). Porém, a síndrome foi melhor apresentada pelo trabalho pioneiro de Leo Kanner, psiquiatra da Universidade Johns Hopkins, em 1942. Ele usou a expressão “distúrbios autísticos do contato afetivo” para descrever 11 crianças que eram acompanhadas por ele e que possuíam um comportamento bastante original. Sugeriu que o grupo de crianças apresentava uma inabilidade inata para estabelecer contato afetivo e interpessoal e que se tratava de uma síndrome bastante rara mas, provavelmente, mais frequente do que esperado pelo pequeno número de casos diagnosticados (GADIA *et al.*, 2004).

Kanner descreveu pela primeira vez o autismo como uma síndrome comportamental caracterizada por alterações na linguagem ou na comunicação, nos relacionamentos sociais (que julgou ser o transtorno patognomônico da síndrome) e na capacidade cognitiva, com gravidade variando de acordo com a profundidade do espectro autista (RIVERA, 2007). Ele também observou respostas incomuns ao ambiente, que incluíam maneirismos motores estereotipados, resistência a mudanças ou insistência na monotonia (KANNER, 1942). Esse conjunto de sinais foi por ele visualizado como uma doença específica relacionada a fenômenos da linha da esquizofrenia (ASSUMPCÃO JR. e PIMENTEL, 2000), o que incentivou psiquiatras da época a utilizarem como sinônimos os termos esquizofrenia infantil, autismo e psicose infantil (RIVERA, 2007).

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

Kanner continuou descrevendo o quadro como “psicose” em trabalho de 1956, referindo que todos os exames clínicos e laboratoriais foram incapazes de fornecer dados quanto sua etiologia, diferenciando-o de déficits sensoriais, como a afasia congênita (KANNER, 1956).

Durante os anos 50 e 60 do século passado, houve muita confusão sobre a natureza do autismo e a sua etiologia, sendo a crença mais comum a de que o autismo era causado por pais não emocionalmente responsivos aos seus filhos, hipótese conhecida como “mãe geladeira”. Na maior parte do mundo, tais noções foram abandonadas, ainda que possam ser encontradas em parte da Europa e da América Latina (KLIN, 2006).

No início dos anos 60, um crescente corpo de evidências começou a acumular-se, sugerindo que o autismo era um transtorno cerebral, presente desde a infância e encontrado em todos os países e grupos socioeconômicos ou étnico-culturais (KLIN, 2006). Dentre as novas teorias, estava a de Rutter, que defendia que o autismo devia-se principalmente a alterações no desenvolvimento da linguagem, hipótese explicativa que se mostrou insuficiente com o passar do tempo (RUTTER, 1978a). Gillbert, em 1990, cita em sua publicação que é altamente improvável que existam casos de autismo não orgânicos, que o autismo é uma disfunção orgânica e não um problema dos pais, e que o novo modo de ver o autismo deve ser biológico (GILLBERG, 1990).

O diagnóstico e as subclassificações do autismo estiveram sob o amplo rótulo de “esquizofrenia infantil” por muitas décadas. As primeiras alterações dessa concepção surgiram a partir de Ritvo em 1976 (ORNITZ e RITVO, 1976), que relaciona o autismo a um déficit cognitivo, considerando-o não uma psicose e sim um distúrbio do desenvolvimento (ASSUMPCÃO JR. e PIMENTEL, 2000). Segundo Rutter, já havia nos anos 70 um reconhecimento de que seria necessário separar desordens mentais graves surgidas na infância das psicoses, cujo aparecimento é mais tardio (BOSA e CALLIAS, 2000).

Um marco na classificação desse transtorno ocorreu em 1978, quando Michel Rutter propôs uma definição do autismo com base em quatro critérios: 1) atraso e desvio sociais; 2) problemas de comunicação; 3) comportamentos incomuns, tais como movimentos estereotipados e maneirismos; e 4) início antes dos 30 meses de idade. Os itens 1 e 2 não poderiam ser somente pelo retardo mental associado (RUTTER, 1978b).

O conceito de Rutter e o crescente número de trabalhos sobre o autismo influenciaram a sua definição no *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Third Edition* (DSM-III), em 1980, quando o autismo foi pela primeira vez reconhecido, separado da esquizofrenia e colocado em uma nova classe de transtornos, denominada “transtorno invasivo do desenvolvimento” (TID). O termo TID foi escolhido para refletir o fato de que múltiplas áreas de funcionamento são afetadas, as manifestações comportamentais são heterogêneas e de que há diferentes graus de acometimento (KLIN, 2006). Na época do *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Third Edition-Revised* (DSM-III-R), em 1987, o termo TID se expandiu, sendo adotado também na décima revisão da Classificação Estatística Internacional de Doenças e Problemas Relacionados à Saúde (CID-10). Foram estabelecidos dois diagnósticos sob o termo transtorno invasivo (ou global) do desenvolvimento: 1) autismo; 2) transtorno invasivo (ou global) do desenvolvimento não especificado (TID-NE). Para o *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*,

Fourth Edition (DSM-IV), em 1994, os novos critérios para o autismo e as várias condições candidatas a serem incluídas na categoria TID, foram avaliados em um estudo internacional, multicêntrico, que incluiu mais de 1.000 casos e mais de 100 avaliadores clínicos (VOLKMAR *et al.*, 1994). Os sistemas de classificação do DSM-IV e da CID 10 tornaram-se equivalentes para evitar possível confusão entre pesquisadores clínicos que trabalham em diferentes partes do mundo guiados por um por outro sistema nosológico. No *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Edition- Text Revised (DSM-IV-TR)* (American Psychiatric Association, 2002), os critérios diagnósticos permaneceram os mesmos.

Devido à necessidade de identificação de subgrupos mais homogêneos de indivíduos autistas tanto para finalidades práticas quanto de pesquisa, os TID foram redefinidos no DSM-IV e DSM-IV-TR: 1) Autismo; 2) AS; 3) TID-NE; 4) Síndrome de Rett; 5) Transtorno Desintegrativo da infância (GADIA *et al.*, 2004). Os três primeiros representam as doenças do espectro autista (MYERS e JOHNSON, 2007). Pacientes com AS apresentavam o prejuízo social do autismo, mas sem retardo mental ou atraso da linguagem. A Síndrome de Rett, causada por mutações no gene MECP2, é caracterizada por sintomas autistas em um de suas fases, enquanto que pacientes com transtorno desintegrativo da infância desenvolvem-se normalmente até nos primeiros 4 a 5 anos de vida e após iniciam um período de desintegração (NAZEER e GHAZIUDDIN, 2012). Nesses manuais, passou-se a exigir como critério diagnóstico para autismo que pelo menos uma das três áreas afetadas tivesse o atraso ou o desvio detectado antes dos 36 meses de idade (RIVERA, 2007).

Embora com os critérios do DSM-IV tenha ficado mais fácil entender cada um dos TID, ainda existem algumas controvérsias. Enquanto a validade do diagnóstico de autismo é inquestionável, o *status* de validade da AS ainda é controverso, mesmo há quase duas décadas da sua formalização no DSM-IV. A controvérsia é relacionada principalmente ao fato deste

diagnóstico ser confundido com o de autismo não acompanhado de retardo mental, ou autismo com alto grau de funcionamento (AAGF). Uma boa dose de confusão ainda cerca o uso do termo síndrome de Asperger ou transtorno de Asperger (KLIN, 2006). Outra controversa refere-se ao transtorno desintegrativo da infância, questionado como entidade diagnóstica válida (GADIA *et al.*, 2004).

No início do ano de 2013, foi publicado nos Estados Unidos o *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition* (DSM-5), que optou por juntar todos os subgrupos sob o termo comum de TEA, e de excluir do grupo o Transtorno de Rett e o Transtorno Desintegrativo da Infância, por serem distúrbios neurológicos, com etiologia distinta (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013).

2.1.2 Aspectos epidemiológicos

Quando foi inicialmente descrito em 1942 (KANNER, 1942), o autismo era mencionado como uma condição rara, afetando não mais que 4 por 100.000. O primeiro estudo epidemiológico sobre o autismo foi realizado apenas em 1966, por Victor Lotter. Nesse estudo, ele relatou um índice de prevalência de 4,5 em 10.000 crianças em toda a população de crianças de 8 a 10 anos de Middlesex, um condado ao noroeste de Londres. Desde então, o número de estudos epidemiológicos tem aumentado muito (KLIN, 2006).

A prevalência estimada na década de 1980-1990 era de 4-5/10.000 habitantes. Na década 1990-2000, aumentou para 30-60/10.000 (DE LA PAZ *et al.*, 2005). Atualmente, acredita-se que o TEA afete cerca de 1% da população (SIMONOFF, 2012). No entanto, a prevalência real não é conhecida, já que não há uma concordância absoluta sobre o que exatamente constitui autismo (FERNELL *et al.*, 2013). Casos de TEA são identificados na população geral de pré-escolares em uma taxa aproximada de 0,8%, ao passo que, em escolares, adolescentes e adultos a taxa atinge 1%. Esses valores seriam para todas as formas de TEA, mas não incluiriam indivíduos apenas com traços autísticos, que podem ser 3-4 vezes

mais frequentes que o transtorno em crianças pequenas (POSSERUD *et al.*, 2006). Nos estudos realizados nos Estados Unidos pelo CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) pode-se visualizar bem esse aumento da prevalência. Em um levantamento realizado em 1998 na área metropolitana de Atlanta, a prevalência do TEA foi de 34 por 10.000 em crianças entre 3 e 10 anos (BERTRAND *et al.*, 2001). No ano de 2000, foi avaliada a prevalência do transtorno em crianças aos 8 anos de idade em 6 estados americanos. A prevalência encontrada foi de 6,7 para cada 1000 crianças, o que levou a conclusão de que o TEA é mais comum do que se acreditava previamente (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2007). Em 2006, o estudo incluiu 11 estados, estimando prevalência de aproximadamente 1% ou 1 criança afetada em cada 110, sendo 1 para cada 70 meninos e 1 para cada 315 meninas, mostrando uma aumento de 57% em 10 estados entre 2002 e 2006. Concluiu que não se poderia afastar um aumento real no risco de crianças desenvolverem autismo (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2009). Finalmente, há 1 ano, foi publicado novo estudo realizado em 14 estados americanos no ano de 2008, com prevalência do transtorno de 1 em cada 88 crianças, afetando 1 menino em cada 54 e uma menina em cada 252, evidenciando um aumento de 23% na prevalência desde 2006 e de 78% desde 2002, confirmando que a sua prevalência continua a crescer (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2012). A idade de 8 anos foi escolhida pelo CDC por ser o pico de prevalência do transtorno (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2009).

Embora a prevalência do TEA varie em diversos estudos epidemiológicos, ela está aumentando continuamente ao longo dos anos. A razão para esse aumento é controversa. Questiona-se se esse aumento é real, já que ele pode estar relacionado a uma série de outros fatores, como mudanças nos critérios diagnósticos, maior conscientização sobre as diferentes manifestações do comportamento autista, melhora dos métodos diagnósticos, melhor detecção

dos casos sem retardo mental (ex. AAGF e AS), o conhecimento de que os TID podem ocorrer em indivíduos com doenças orgânicas identificadas, como a síndrome de Down e a esclerose tuberosa e às campanhas para identificação e intervenção precoces (CHARMAM *et al.*, 2004; KLIN, 2006). Também é possível que esteja havendo super diagnóstico ou que o aumento se deva, pelo menos em parte, a diferença de metodologias utilizadas nos estudos (SPENCER *et al.*, 2004). Mesmo acreditando que todos esses fatores possam estar aumentando a prevalência do TEA, não se descarta a existência de uma epidemia de autismo devida a fatores não bem conhecidos. Organismos, como o CDC, têm apresentado o autismo como uma epidemia e um motivo de alarme nacional, o que tem levado a amplas campanhas para novas pesquisas (DE LA PAZ *et al.*, 2005). Até os dias de hoje, não existem evidências convincentes de que a epidemia realmente exista e fatores de risco ambientais que poderiam estar agindo como “ativadores” (ex. programas de vacinação) não tiveram nenhuma validação em estudos de grande escala realizados em vários países (KLIN, 2006).

Um achado interessante nos estudos epidemiológicos é a maior incidência de autismo em meninos do que em meninas, com proporções médias relatadas de 3,5 a 4,0 meninos para cada menina. Essa proporção varia em função do grau de funcionamento intelectual. A AS é 8 vezes mais frequente em meninos (DE LA PAZ *et al.*, 2005). Alguns estudos relatam proporções de até 6 meninos para uma menina em indivíduos com autismo sem retardo mental, ao passo que as proporções entre os que tinham retardo mental moderado a grave eram de 1,5 para 1. Meninas autistas têm maior probabilidade de terem retardo mental grave. Ainda não está claro porque as mulheres têm uma menor representação na faixa sem retardo mental (KLIN, 2006). Alguns estudos recentes sugerem que meninas e mulheres com fenótipos mais sutis possam ter a mesma desordem da comunicação social típicas de meninos e homens com autismo, e que a “real” relação possa ser muito menor e próxima dos 1: 2,

frequentemente reportada para outros transtornos do desenvolvimento como o retardo mental (KOPP *et al.*, 2010).

2.1.3 Manifestações clínicas

O TEA é um distúrbio mental que se manifesta por uma grande variedade de sintomas nas áreas cognitiva, emocional e neurocomportamental. Apesar das características que compõem a tríade diagnóstica serem bem definidas, a grande heterogeneidade dos achados em cada criança ou adolescente torna o seu reconhecimento desafiador. O transtorno engloba fenótipos extremamente heterogêneos, principalmente nos casos mais brandos do espectro, e a gravidade dos déficits centrais varia grandemente entre os indivíduos com o transtorno (MYERS e JOHNSON, 2007; STANKOVIC *et al.*, 2012).

Os principais sintomas são déficits de interação social, déficits de comunicação e padrões restritos e repetitivos de comportamento, interesses e atividades, que constituem a conhecida tríade diagnóstica de Wing. Embora esses sintomas possam ocorrer em uma variedade de transtornos psiquiátricos, é a junção desses sintomas em um mesmo indivíduo que torna o TEA único e fascinante. Como o transtorno é crônico e os sintomas podem variar com a idade, é muito importante questionar se o paciente apresentou os sintomas em outros momentos da vida. Durante a infância, as crianças com autismo costumam apresentar mais déficits de linguagem e agitação. Já na adolescência, os sintomas mais importantes podem ser os problemas de relacionamento e de modulação do humor (NAZEER e GHAZIUDDIN, 2012).

Em aproximadamente 25 a 30% das crianças afetadas pode haver uma parada ou uma regressão do desenvolvimento entre os 15 e os 21 meses de idade. Esta pode envolver a perda do uso de palavras (geralmente no estágio de fala de menos de 10 palavras), acompanhada de regressão social, com perda do contato visual, interesse por brincadeiras e mudanças no hábito de sono e alimentar. O início de comportamentos não usuais como olhar fixamente para

alguns objetos, *flapping* ou outros maneirismos também podem ser notados. No entanto, em muitos desses casos, uma história cuidadosa pode revelar que a comunicação social estava sutilmente anormal antes do início da regressão e que as palavras perdidas podem não ter sido usadas de forma comunicativa (MYERS e JOHNSON, 2007; BAIRD *et al.*, 2001). A história de um possível fator precipitante, como uma infecção, pode ou não estar presente. Em algumas crianças, a regressão parece coincidir com o início de crises convulsivas. No entanto, em geral, não há na história uma causa óbvia (NAZEER e GHAZIUDDIN, 2012). Essas crianças devem ser submetidas a uma avaliação médica cuidadosa a fim de afastar condições neurodegenerativas, síndrome de Rett e epilepsia, que podem se apresentar dessa forma (MYERS e JOHNSON, 2007). A regressão autística é muito rara antes de um ano de idade. Nessa situação, devem-se buscar outras condições médicas que podem causar uma regressão semelhante, como a que acompanha os espasmos infantis associados à esclerose tuberosa (OLIVIÉ, 2012).

2.1.3.1 Déficits de Interação Social

Os déficits sociais geralmente estão presentes já nos primeiros dois anos de vida. Embora mais específicos para o TEA que os déficits de linguagem, muitas vezes passam despercebidos pelos pais (MYERS e JOHNSON, 2007).

Déficit no relacionamento social é definido como a incapacidade de interagir com outras pessoas e compartilhar emoções. Crianças com TEA têm preferência por atividades solitárias, parecem não procurar contato, ignorando as tentativas dos pais ou de outras pessoas em chamar a sua atenção e raramente olham diretamente nos olhos ou buscam a atenção dos outros com gestos ou vocalizações. Muitas vezes, são descritas pelos pais “como se estivessem no seu próprio mundo” (SPENCER *et al.*, 2004).

Uma das mais reconhecíveis características de TEA em crianças pequenas é o déficit de atenção compartilhada, que é a capacidade de compartilhar com outra pessoa interesse ou

atenção em um objeto ou em uma atividade, quando há troca de olhares entre elas e o objeto. Gestos e fala podem ser usados para atrair a atenção da outra pessoa para o objeto ou para o evento, apenas para diversão ou troca de experiências. Em crianças normais, ela se desenvolve já nos primeiros meses de vida (MYERS e JOHNSON, 2007). Outro mecanismo básico de socialização presente em bebês típicos é a atenção seletiva para faces sorridentes ou vozes agudas, que levam as crianças a procurar os cuidadores. Em bebês e crianças com autismo a face humana e as vozes agudas despertam pouco interesse (KLIN, 2006).

A resposta ao próprio nome e o referenciamento também são habilidades sociais precoces que geralmente estão ausentes. A resposta ao próprio nome geralmente está presente em torno dos 8-10 meses de idade. No entanto, sua ausência não é específica já que pode ocorrer em crianças com déficit auditivo. Os pais costumam relatar que a criança parece ouvir muito bem sons ambientais, mas não a voz humana, como se tivesse uma audição seletiva. O referenciamento social, que é a habilidade de reconhecer o estado emocional do outro em resposta a vários estímulos, também é comprometido. Quando a criança se depara com uma situação nova, tende a olhar a face da mãe na busca de uma indicação de prazer, raiva ou medo. A sua expressão facial então geralmente imita a da mãe, embora possa não estar entendendo a situação. A criança com TEA não apresenta essa imitação (MYERS e JOHNSON, 2007).

Devido ao comprometimento das habilidades sociais básicas, as crianças com TEA relacionam-se pouco com pares. Quando maiores essas apresentam dificuldade de se engajar em jogos habituais da infância que exijam imitação e cooperação, de formar grupos e de ter amigos (KLIN, 2006). Geralmente têm nenhum ou poucos amigos e, quando os têm, pode ser por um interesse especial. A amizade é prejudicada pela incapacidade de interpretar um estímulo como um todo, já que costumam focar em partes, fazendo com que não assimilem o contexto. Também apresentam dificuldade em entender a perspectiva do outro, de adivinhar o

que outra pessoa está sentindo ou pensando com base no seu comportamento. Esta capacidade é conhecida como “teoria da mente”, e geralmente já está presente em algum grau a partir dos 4 anos de idade. Devido a isso, apresentam dificuldades na empatia, na capacidade de copartilhar e confortar (MYERS e JOHNSON, 2007). Os adolescentes e adultos têm interpretações equivocadas a respeito de como são percebidos por outras pessoas, e o adulto autista, mesmo com habilidades cognitivas adequadas, tende a se isolar (GADIA *et al.*, 2004).

Contrastando um pouco com a representação social no autismo, os indivíduos com AS encontram-se socialmente isolados, mas não são usualmente inibidos na presença de outras pessoas. Normalmente, indivíduos com AS os abordam, mas de forma inapropriada e excêntrica. Expressam interesse em fazer amizades e encontrar pessoas, mas seus desejos são invariavelmente frustrados por suas abordagens desajeitadas e pela insensibilidade em relação aos sentimentos e intenções das demais pessoas. Cronicamente frustrados pelos seus repetidos fracassos de envolver outras pessoas e de estabelecer relações de amizade, alguns indivíduos com AS desenvolvem sintomas de transtorno de ansiedade ou de humor, que pode requerer tratamento (KLIN, 2006).

2.1.3.2 Déficit de comunicação

A maioria das crianças que posteriormente irão receber o diagnóstico e TEA apresentam como queixa inicial o atraso na fala. Os pais notam que algo está errado geralmente em torno dos 18 meses de idade. O atraso na fala tem sido considerado uma das características principais do TEA, principalmente quando se acompanha de falta de vontade de se comunicar e não compensação da falta da fala com o uso de gestos. No entanto, crianças com sintomas mais leves, principalmente aquelas com cognição preservada podem desenvolver alguma fala, que costuma ser não funcional e fluente e sem intenção comunicativa. Essa pode ser copiada de vídeos favoritos ou programas de televisão e ser estereotipada. Indivíduos com TEA podem apresentar ecolalia, que é a repetição da fala de outra pessoa, que pode ser imediata,

quando é repetida prontamente após se ouvida, ou tardia, quando há um atraso de horas, dias ou mesmo semanas (MYERS e JOHNSON, 2007).

Cerca de 20 a 30% dos autistas nunca falam. Esse percentual é considerado menor que há 15 a 20 anos atrás, graças, em parte, à intervenção precoce e intensiva. Quando chegam a falar, a linguagem apresenta várias peculiaridades, tendendo a ser menos flexível, com inversão pronominal e entonação apagada ou monótona. O humor e o sarcasmo podem ser fonte de confusão na comunicação, já que a pessoa com autismo pode não conseguir apreciar a intenção de comunicação do falante, resultando em uma interpretação completamente literal da declaração (KLIN, 2006).

Algumas crianças autistas podem desenvolver a fala tardiamente, passando da ausência total de fala ou do uso apenas de jargões para uma fala clara, fluente e com frases bem formadas, mas seu discurso geralmente é literal, repetitivo, não comunicativo e marcado por ecolalias ou discursos já memorizados (RAPIN, 1997).

Nos indivíduos com AS, embora não haja atraso na aquisição da fala, há uma notável pobreza na comunicação não verbal, envolvendo tanto gestos quanto tom afetivo de voz, com a empatia pobre e tendência a intelectualizar as emoções. A fala muitas vezes é incoerente, em monólogo e tende a ser prolixa e formal. Seus interesses tendem a ocupar totalmente o foco da conversa, com tópicos não usuais. Geralmente desenvolvem precocemente uma linguagem altamente correta do ponto de vista gramatical e por isso, muitas vezes, não são diagnosticados nos primeiros anos de vida (KLIN, 2006).

2.1.3.3 Padrões restritos e repetitivos de comportamento, interesses e atividades

Crianças com TEA podem apresentar comportamentos atípicos que incluem maneirismos motores, uso de objetos de forma não usual, obsessões, compulsões e estereotípias. Estereotípias são comportamentos atípicos repetitivos, não funcionais como *flapping* das mãos, estalar dos dedos, balanceios, caminhar na ponta dos pés, girar e outros

maneirismos. Embora a maioria das estereotípias não traga riscos, elas podem evitar que a criança desenvolva novas habilidades. Esses movimentos são realizados como uma fonte de prazer ou forma de se auto-acalmar e podem se exacerbar em situações de estresse (KLIN, 2006). Embora facilmente reconhecidas, as estereotípias não são específicas de crianças com TEA, podendo também ser encontradas em crianças com retardo mental profundo ou déficits sensoriais. Mesmo crianças normais, geralmente lactentes que ainda não adquiriram linguagem fluente, podem apresentar *flapping* quando excitados ou frustrados. Estereotípias associadas ao TEA usualmente não aparecem antes dos três anos de idade (MYERS e JOHNSON, 2007).

Crianças autistas frequentemente apresentam dificuldade em tolerar alterações ou variações na rotina. Os pais podem relatar que a criança insiste em que eles participem das atividades de formas muito específicas. As alterações na rotina ou no ambiente podem evocar grande oposição ou contrariedade. Nas crianças pequenas, as vinculações aos objetos, quando ocorrem, diferem dos objetos transicionais habituais (cobertores, travesseiros, ursos de pelúcia,...), com preferência por itens duros, como aviões, chaves, tampinhas,... (KLIN, 2006).

Os déficits no brincar podem incluir a falha no desenvolvimento de padrões usuais de desempenho de papéis, de brincadeiras de faz-de-conta, simbólicas ou imaginativas. A criança autista pode explorar os aspectos não funcionais dos brinquedos, como o gosto ou o cheiro, ou usar partes dos brinquedos para auto-estimulação (KLIN, 2006). Muitas vezes contemplam o brinquedo por horas, requerendo pouca atenção ou supervisão (MYERS e JOHNSON, 2007). Pode haver apego excessivo a objetos específicos e fascínio com o movimento de peças, principalmente com movimentos de rotação. Raramente participam de jogos ou brincadeiras sociais que envolvam cooperação.

2.1.3.4 Sintomas secundários ou comórbidos

Os pacientes com TEA também apresentam déficits no funcionamento executivo e na capacidade mental de resolver problemas, além de dificuldade de integrar informações para produção de um significado. Alterações no processamento sensorial são frequentes. Essas crianças e adolescentes podem apresentar tanto hipo quanto hipersensibilidade a estímulos sensoriais de uma mesma modalidade ou em múltiplos domínios sensoriais (visual, auditivo, olfativo, palatal, tátil (OLIVIE, 2012). Muitas crianças parecem insensíveis à dor e podem não chorar após ferimentos graves. Podem ser fascinadas por certos estímulos sensoriais, como objetos que giram, ou partes de brinquedos que podem girar (KLIN, 2006). Atraso no desenvolvimento motor ou dificuldades de coordenação motora também podem existir.

Hiperatividade, auto e heteroagressividade ocorrem em mais da metade dessas crianças. Esses sintomas são mais comuns nos indivíduos com deficiência cognitiva e afetam significativamente a qualidade de vida do indivíduo afetado e de sua família. A agressividade não provocada, se não tratada precocemente, costuma ser o principal motivo de tratamento medicamentoso ou institucionalização (RAPIN, 1997). Crianças autistas com grau de funcionamento menor podem morder as mãos e punhos, muitas vezes levando a sangramentos ou formações calosas. Podem cutucar excessivamente a pele, arrancar seus cabelos, bater no peito ou golpear-se, muitas vezes na cabeça, levando ao uso de capacetes ou outros dispositivos protetores nos casos graves. Acessos de ira são comuns, particularmente em reação às exigências impostas, alterações na rotina ou eventos inesperados. A falta de compreensão ou a incapacidade de se comunicar, ou a frustração total, podem levar a explosões de agressividade (KLIN, 2006).

Sintomas depressivos frequentemente surgem na adolescência, algumas vezes com depressão, sintomas psicóticos e comportamento suicida (NAZEER e GHAZIUDDIN, 2012). No final da adolescência ou no início da idade adulta, indivíduos com TEA podem ter os

movimentos do corpo muito lentificados e até mesmo desenvolver catatonia, situação de risco à vida que pode ocorrer em até 10 a 15% dos pacientes com AS (WING e SHAH, 2000).

Quanto à cognição, retardo mental é encontrado em 60 a 70% desses indivíduos. O grau de retardo mental pode variar de leve a profundo, sendo a maioria na faixa moderado a grave (NAZEER e GHAZIUDDIN, 2012). O perfil típico em testes psicológicos é de déficits significativos de raciocínio abstrato, formação de conceitos verbais e habilidades de integração, e nas tarefas que requerem raciocínio verbal e compreensão social. Por outro lado, os pontos fortes costumam ser observados nas áreas de aprendizado mecânico e habilidades de memória e solução de problemas visuo-espaciais. Há preferência típica por raciocínios repetitivos e sequenciais, mais do que por tarefas de raciocínio e integração, implicando em uma forma fragmentada de aprendizado (KLIN, 2006). A capacidade cognitiva deve ser avaliada e considerada, já que é um dos fatores mais importantes para as intervenções, para o desenvolvimento e para o prognóstico (FERNELL *et al.*, 2011).

Um dos mais fascinantes fenômenos cognitivos no autismo é a presença das denominadas “ilhas de habilidades especiais” ou *splinter skills*. Essas consistem em habilidades preservadas ou altamente desenvolvidas em certas áreas que contrastam com os déficits gerais de funcionamento da criança. Não é incomum, por exemplo, que as crianças com autismo tenham grande facilidade de decifrar letras e números, às vezes precocemente (hiperlexia), mesmo que a compreensão do que lêem esteja muito prejudicada. Alguns indivíduos com TEA apresentam um desempenho alto, às vezes prodigioso, em uma habilidade específica (“*savant*”) na presença de retardo mental leve ou moderado. Acreditava-se que essas habilidades não eram comuns em indivíduos com autismo, no entanto, Howling e colaboradores mostraram em uma revisão sistemática que aproximadamente um terço as apresenta (HOWLIN *et al.*, 2010). Nessa revisão, não foram encontradas ilhas de habilidades em indivíduos com QI não verbal inferior a 50, devendo-se abandonar o termo

“*Idiot Savant*” (RUTTER, 2011). Esse fascinante fenômeno relaciona-se a um âmbito reduzido de capacidades, como memorização de listas ou informações triviais, cálculos de calendários, habilidades visuo-espaciais, como desenho ou habilidades musicais, como tocar uma música após tê-la ouvido apenas uma vez. Raramente, o desenvolvimento de talentos ou de uma habilidade específica pode ser capaz de gerar independência financeira ou reconhecimento (MYERS e JOHNSON, 2007).

Distúrbios do sono e alimentares podem ser muito esgotantes na vida familiar de indivíduos com TEA, particularmente durante a infância (KLIN, 2006). A prevalência dos distúrbios do sono é de 44% a 83%, ocorrendo em todos os níveis de habilidades cognitivas. Usualmente iniciam aos dois anos de idade, com padrões erráticos de sono e despertares frequentes à noite. Os mais frequentes são a insônia inicial, o sonambulismo e as irregularidades no ciclo do sono (OLIVIÉ, 2012). Os distúrbios alimentares podem envolver a aversão a certos alimentos pela textura, cor ou odor, a insistência em comer somente uma pequena seleção de alimentos e a recusa de provar alimentos novos (KLIN, 2006), e não tendem a melhorar ou desaparecer com a idade (OLIVIÉ, 2012). Além desses distúrbios, problemas gastrointestinais também são comuns, como constipação crônica, dor abdominal com ou sem diarreia, refluxo gastroesofágico, distensão abdominal e deficiência de dissacaridases (BUIE *et al.*, 2010).

A prevalência de epilepsia em autistas é alta. A sua associação com epilepsia e retardo mental é o principal motivo para se acreditar em uma origem biológica para o transtorno. Crises convulsivas ocorrem em pelo menos 30% dos indivíduos com autismo clássico, geralmente em idade escolar ou próximo da puberdade (NAZEER e GHAZIUDDIN, 2012), mas em muitos casos podem iniciar após a adolescência. A epilepsia é mais comum nos indivíduos com comprometimento grave da linguagem ou retardo mental, porém ocorre em autistas com todos os níveis de inteligência e parece não estar relacionada com regressão ou o

com surgimento de outras condições médicas, como distúrbios psiquiátricos (RUTTER, 2011). O tipo mais comum de crise é a parcial simples, com ou sem generalização secundária, mas outros tipos de crise podem ocorrer (DUCHAN e PATEL, 2012; NAZEER e GHAZI UDDIN, 2012). As meninas apresentam risco maior de desenvolver epilepsia (DUCHAN e PATEL, 2012).

2.1.4 Diagnóstico

Como não há marcador biológico que defina o TEA, o seu diagnóstico é clínico e realizado pela observação direta da criança e pelo relato dos pais e/ou cuidadores. Para o diagnóstico é necessário um conjunto de sintomas, geralmente mais evidentes a partir dos dois ou três anos de idade (SELDAS, 2012).

2.1.4.1 Critérios diagnósticos

Os critérios diagnósticos atualmente utilizados são os do DSM-5 (APÊNDICE A -) (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013), lançado no início de 2013 nos Estados Unidos. O DSM-5 mudou a organização do diagnóstico de autismo pela constatação de que a diferenciação entre TEA, desenvolvimento típico ou normal e entre outros transtornos “fora do espectro” é válida e segura. No entanto, as distinções entre os transtornos do espectro têm se mostrado inconsistente, já que as fronteiras não são bem definidas, o que torna muitas vezes o diagnóstico difícil e inconstante com o passar do tempo (STANKOVIC *et al.*, 2012).

A principal mudança no DSM-5 em relação ao DSM-IV-TR (APÊNDICE B -) é a eliminação das categorias Autismo, AS, Transtorno Desintegrativo da Infância e TID-NE, existindo apenas a denominação “Transtornos do Espectro Autista”. Como o autismo se apresenta como um conjunto de sintomas, que pode variar muito mesmo entre indivíduos com o mesmo subgrupo do espectro, acredita-se que ele possa ser melhor representado por uma

única categoria diagnóstica. A segunda mudança foi a junção de déficits na comunicação e nos comportamentos sociais em um mesmo domínio, já que esses são inseparáveis e melhor avaliados em conjunto. A terceira alteração foi que os sintomas devem estar presentes desde a infância precoce, sem estipular a idade limite para o início dos sintomas em três anos. A mudança foi realizada pelo fato de que muitos sintomas podem não ser aparentes até que as demandas sociais excedam o limite da capacidade (NAZEER e GHAZIUDDIN, 2012). A Síndrome de Rett e o Transtorno Desintegrativo da Infância foram excluídos dos TEA por serem distúrbios reconhecidamente mais neurológicos que psiquiátricos. Estudos realizados para avaliar a validade dos critérios propostos pelo DSM-5 mostraram que esse é mais específico que o DSM-IV-TR, reduzindo falsos positivos (FRAZIER *et al.*, 2012).

2.1.4.2 Instrumentos Diagnósticos

Nas últimas décadas, vários instrumentos foram desenvolvidos para auxiliar no diagnóstico do TEA, com base nos critérios do DSM. Os dois instrumentos mais detalhados e atualmente considerados padrão-ouro para o diagnóstico de autismo são a *Autism Diagnostic Observation Schedule* (ADOS) (LORD *et al.*, 1989) e a *Autism Diagnostic Interview-Revised* (ADI-R) (LORD *et al.*, 1994). O primeiro é um método de observação e o segundo uma entrevista semi-estruturada. Ambos são demorados, exigem treinamento prévio, e são utilizados principalmente para pesquisa.

Outros instrumentos foram criados para serem escalas objetivas de avaliação para crianças autistas, permitindo mensurar o grau de comprometimento apresentado. Uma das escalas mais conhecidas é a *Childhood Autism Rating Scale* (CARS) (SCHOPLER *et al.*, 1988), utilizada para diagnóstico e avaliação de intervenções terapêuticas, e que classifica o autismo em leve ou moderado a severo.

Vários outros instrumentos foram criados para screening e diagnóstico, como a *The Social Communication Questionnaire* (SCQ); *Scale of Autistic Traits* (ATA); *Autism*

Screening Questionary (ASQ), *Cheklis for Autism in Toddlers (CHAT)* e *Modified Cheklis for Autism in Toddlers (M-CHAT)*, *Pervasive Developmental Disorders Screening Test (PDDST)*, *The Gilliam Autism Rating Scale (GARS)*. Desses, o M-CHAT é o mais utilizado atualmente.

A CARS e a ATA já foram traduzidas e validadas para uso no Brasil (PEREIRA *et al.*, 2008; ASSUMPÇÃO *et al.*, 1999), e a ADI-R está em processo de validação (BECKER *et al.*, 2012).

2.1.4.3 Diagnóstico precoce

As intervenções que ocorrem cedo no desenvolvimento da criança podem se beneficiar da maior plasticidade cerebral, com melhores desfechos (LEBLANC e GILLIS, 2012). A média de idade em que os pais demonstram preocupação ao pediatra é de 14 a 17 meses (CHAWARSKA *et al.*, 2007; DE GIACOMO e FOMBONNE, 1998), mas a média de idade do diagnóstico é significativamente maior, sendo de 5 anos (DE LA PAZ *et al.*, 2005). Estudos mostram que os diagnósticos realizados em idade precoce têm mostrado estabilidade, podendo o TEA ser detectado de forma acurada em crianças menores que três anos de idade (CHARMAN e BAIRD, 2002; KLEINMANN *et al.*, 2008).

A Academia Americana de Pediatria recomenda que os pediatras mantenham-se atentos aos sintomas do TEA a cada consulta e que os triem através de instrumentos padronizados em intervalos específicos, sendo recomendando as consulta dos 18 e dos 24 meses de idade, ou em qualquer momento se os pais mostrarem alguma preocupação que remeta ao autismo (MYERS e JOHNSON, 2007; DUCHAN e PATEL, 2012). Devem estar especialmente atentos aos sintomas em lactentes irmãos de crianças autistas, já que estes apresentam 20 vezes mais risco de desenvolver o transtorno que outras crianças (BÖLTE *et al.*, 2013).

Alguns instrumentos são utilizados para rastreamento de sinais precoces, como *Checklist for Autism in Toddlers (CHAT)*, *Early Screening for Autistic Traits (ESAT)*, *The*

Modified-CHAT e *The Infant Toddler Checklist (ITC)*, com possibilidade de identificá-lo prospectivamente aos 18 meses de idade ou mesmo antes (BÖLTE *et al.*, 2013).

Muitos estudos estão tentando mapear a trajetória do TEA no neurodesenvolvimento das crianças afetadas, com a utilização de fitas de vídeo, relato dos pais, estudos de rastreamento e, mais recentemente, estudos prospectivos com bebês de alto risco de desenvolvimento do transtorno, geralmente irmãos de crianças afetadas, que apresentam 20% de chance de desenvolver o transtorno. Estes últimos têm mostrado que aos seis meses de idade não são encontradas diferenças entre bebês com TEA e bebês com desenvolvimento típico (BÖLTE *et al.*, 2013; SELDAS, 2012), o que parece contradizer a afirmação de Kanner (KANEER, 1942), de que o autismo estaria presente desde o nascimento.

Os sinais mais precoces costumam ser atrasos ou déficits na resposta ao nome, na atenção compartilhada e brincar limitado ou perseverativo. No entanto, muitos desses sintomas não são específicos ou universais do TEA, com baixo valor preditivo e risco de encaminhamentos excessivos para intervenções, principalmente em rastreamentos iniciais (BÖLTE *et al.*, 2013).

As primeiras dificuldades específicas são observadas no final do primeiro ano, nas áreas social e comunicativa: olham pouco na face dos cuidadores, respondem menos ao nome e utilizam menos gestos nas interações sociais. A partir de um ano, vão surgindo outras dificuldades sociais, comunicativas, simbólicas e, em alguns casos, também condutas e interesses repetitivos e estereotipados, assim como interesses sensoriais atípicos. Costumam ter atraso na linguagem expressiva e receptiva, e menos atenção compartilhada. Aos 12 meses também surgem dificuldades fora da tríade do TEA, como a mudança do temperamento. Deixam de ser passivos como aos 6 meses de idade para mostrar-se muito irritados, com reações de mal estar extremo frente a uma variedade de estímulos. No segundo ano de vida, a quantidade e a gravidade dos problemas começam a distinguir melhor o TEA de outros

transtornos do desenvolvimento, sendo os déficits sociais e comunicativos os que mais claramente os diferenciam (Tabela 1). No segundo ano de vida, são especialmente marcadas as limitações para compartilhar interesse (SELDAS, 2013).

A importância do reconhecimento do autismo em idade precoce tem sido discutida em muitos estudos. Há consenso de que ele seja importante por permitir que a criança inicie antes as intervenções terapêuticas, tenha adaptação comportamental e educacional e que os pais e a escola tenham informações sobre os seus problemas cognitivos. No entanto, quando se discute as suas vantagens no sentido do desenvolvimento, das comorbidades e das condições médicas associadas, existe limitada evidência de que os programas de intervenção precoce sejam efetivos em mudar os desfechos naturais a longo prazo (FERNELL *et al.*, 2013). Revisão realizada por Warren e colaboradores, que incluiu estudos de 2000 a 2010, encontrou alguma evidência de melhora com a intervenção precoce na performance cognitiva, nas habilidades de linguagem e comportamento adaptativo em alguns grupos de crianças com TEA (WARREN *et al.*, 2011). Já um estudo de follow-up de crianças pré-escolares que receberam intervenção precoce, aqueles que tiveram diagnóstico de TEA e intervenção muito cedo não tiveram melhores desfechos que as crianças que tiveram o diagnóstico e início de intervenção mais tardios no período pré-escolar (FERNELL *et al.*, 2011).

Tabela 1 - Sintomas do autismo do nascimento aos 2 anos de idade

	9-12 meses	12 meses	18 meses	18-24 meses
Área Social	<olhar na face <resposta ao nome	<olhar na face <resposta ao nome <sorriso social <interesse por atividades de outros >expressões atípicas <compartilhar alegria <resposta emocional <responsividade	<olhar na face <resposta ao nome <dirigir expressões faciais variadas >qualidade global atípica	<olhar na face <resposta ao nome <sorriso social <variedade expressões emocionais <compartilhar alegrias <resposta emocional <oferecer consolo
Comunicação e linguagem	<gestos, expressão facial	<iniciar atos atenção conjunta <seguir o olhar <solicitações <quantidade gestos <vocalizações dirigidas -atraso linguagem expressiva e receptiva	<iniciar condutas de atenção conjunta <seguir com o olhar <frequencia de atos comunicativos dirigidos; <frequencia e complexidade de atos comunicativos, independente de sua função; <quantidade de gestos <coordenação dos atos comunicativos não verbais -atraso linguagem expressiva -atraso linguagem receptiva >entonação atípica	<iniciar condutas de atenção conjunta <seguir olhar ou gestos <condutas referência social <alternar o olhar <atos comunicativos dirigidos <quantidade e complexidade gestos <coordenação dos atos comunicativos não verbais <vocalizações com consoantes -atraso linguagem expressiva -atraso linguagem receptiva >vocalizações atípicas <entonação
Jogos e imitação		<imitação	<imitação <jogos simbólicos	<imitação <jogos simbólicos
Repertório restrito e comportamento repetitivo	>comportamentos repetitivos	>condutas repetitivas com objetos	>condutas e interesses repetitivos	>quantidade (3 ou mais) ou intensidade das condutas repetitivas

	9-12 meses	12 meses	18 meses	18-24 meses
Alterações sensoriais e temperamento		>condutas sensoriais atípicas >reações de mal-estar extremo; >dificuldade para acalmar-se >maior interesse por objetos	>condutas sensoriais atípicas	<expressão afeto positivo <regulação do estado emocional >atividade motora >irritabilidade > dificuldade para acalmar-se
Atenção		>dificuldade para trocar o foco de atenção		

Negrito: diferença entre crianças com TEA e outros transtornos do desenvolvimento em pelo menos um estudo. Os símbolos > e < indicam, respectivamente, maior ou menor frequência, duração ou intensidade

Fonte: Adaptado de SELDAS, 2012.

2.1.5 Etiologia

O TEA é uma desordem neurocomportamental complexa, de forte base genética e com mais de 100 genes envolvidos (BETANCUR, 2010). O papel da genética é fortemente sugerido pelo risco 15 a 20 vezes maior de recorrência em irmãos de crianças afetadas em comparação com a população geral e por 60 a 90% de concordância em gêmeos monozigóticos contra 10% em gêmeos dizigóticos (LEVY *et al.*, 2009). Acredita-se que seja um transtorno multifatorial com muitos fatores de risco agindo juntos na produção do fenótipo. A diferença entre as taxas de concordância entre homozigóticos e dizigóticos sugere interações entre os fatores de risco (gene-gene ou gene-ambiente) que podem resultar de fatores tóxicos ambientais ou epigenéticos, que alterariam o funcionamento do gene (LEVY *et al.*, 2009).

Até o momento, poucas causas não genéticas são reconhecidas (Tabela 2), como encefalite herpética, infecções congênicas (ex. embriopatia por rubéola), síndrome alcoólica-fetal e exposição pré-natal ao ácido valpróico (OLIVIÉ, 2012). Alguns estudos sugerem que a exposição intra-útero a talidomida e ao misoprostol (abortivo comumente utilizado na América do Sul) também são fatores de risco para autismo (MILES, 2011).

Tabela 2 - Patologias associadas ao autismo

Genéticas/Cromossômicas	Neurometabólicas	Outras
Sínd. X-Frágil	Smith-Lemli-Optiz	Encefalite herpética
Esclerose Tuberosa	Sínd. San Filippo	Infecções congênicas
Neurofibromatose	Deficiência adenilsuccinato	Sínd. Alcoólico-Fetal
22q11 deleção	Sínd. Deficiência Creatinina	Exposição pré-natal valproato
Sínd. Angelmann	Fenilcetonúria	Exposição pré-natal misoprostol
Sínd. Rett	Lipofuscinose ceróide	Exposição pré-natal talidomida
Sínd. Down	Histidinemia	Intoxicação por chumbo
Sínd. Smith-Magenis	Dist. Metabolismo Purinas	Cirurgia no cerebelo (meduloblastoma)
Distrofia Muscular de Duchenne		
Sínd. de Joubert		
Sínd. Cohen		

Fonte: GADIA *et al.*, 2004; OLIVIÉ, 2012.

fatores de risco genéticos são heterogêneos e permanecem desconhecidos na maioria dos casos. Uma grande variedade de mecanismos pode estar envolvida, como desordens genéticas únicas, anormalidades cromossômicas e variação no número de cópias (uma variação estrutural no genoma na qual o material pode ser duplicado ou ter deleções). Esses diferentes mecanismos resultam em riscos de herdabilidade muito variados, sendo fundamental o papel do geneticista no aconselhamento genético de famílias que apresentam algum membro afetado (OLIVIÉ, 2012).

Atualmente, recomenda-se investigação com cariótipo convencional e a pesquisa da mutação para X-Frágil para todos os indivíduos com TEA. Cerca de 3% dos autistas têm Síndrome do X-Frágil (LEVY *et al.*, 2009), que é uma desordem genética causada pela expansão da repetição CGG (>200) no gene ligado ao X FMR1, levando a deficiência ou a ausência da proteína FMR1. Aproximadamente um terço desses indivíduos tem autismo. A Síndrome do X-Frágil é a causa genética mais comum de deficiência mental. No entanto, meninas são menos afetadas cognitivamente que os meninos pelo efeito modificador do segundo cromossoma X, que é normal. Estudos sugerem alto risco de transtornos neuropsicológicos incluindo autismo em indivíduos com a pré-mutação para X-Frágil (55 a 200 repetições CGG) (HAGERMAN *et al.*, 2011). Ao lado do X-Frágil, várias outras síndromes genéticas estão associadas ao TEA (Tabela 2), como as Síndromes de Angelmann, de Williams e de Moebius, entre outras. Juntas, elas correspondem a 10% de todos os casos (OLIVIÉ, 2012).

Anormalidades cromossômicas casuais podem ser identificadas por técnica de hibridização genômica de microarray, aumentando a identificação de uma causa genética para 25% dos casos (MILES, 2011). A maior resolutividade dessa técnica permite a detecção de deleções e multiplicações submicroscópicas conhecidas como “variação de número de cópias”

(CNVs). No entanto, sua interpretação clínica em pacientes com TEA permanece um grande desafio, já que CNV raras ou muito raras podem estar presentes em membros da família assintomáticos ou na população em geral (<0,5%), sendo muito difícil a sua utilização em aconselhamentos e a determinação de causa efeito (MYERS e JOHNSON, 2007; OLIVIÉ, 2012). Em indivíduos com autismo, as CNV são encontradas em número muito maior que nos controles (5%) (COOK e SCHERER, 2008).

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

2.1.6 Neurobiologia

Devido à grande heterogeneidade na forma como o TEA se expressa, não é surpresa que tentativas de se identificar uma teoria explicativa única para o autismo tenham sido fracassadas (LEVY *et al.*, 2009).

Os achados neurobiológicos suportam diferentes teorias. Por ser uma desordem do desenvolvimento, pesquisadores têm estudado o crescimento cerebral e suas redes de funcionamento, neuropatologia, neurofisiologia e neuroquímica. Estes estudos indicam que há diferenças fundamentais no crescimento e na organização cerebral em indivíduos com TEA por um longo período, que pode ir desde a vida pré-natal até a vida adulta. A associação do aumento do risco de autismo com a exposição pré-natal a teratógenos, como a talidomida e o ácido valpróico, sugerem que insultos precoces durante períodos críticos do desenvolvimento cerebral (tão cedo quanto 20-24 dias pós-concepção no caso da talidomida) possam ser suficientes para causar o transtorno (MYERS e JOHNSON, 2007).

Macrocefalia é encontrada na idade entre 2-3 anos em 20% das crianças com TEA. O crescimento cerebral acelera aos 12 meses de idade, paralelo ao surgimento dos principais sintomas do espectro (MINSHEW e WILLIAMS, 2007; REDCAY e COURCHESNE, 2005). Poucos adultos autistas apresentam macrocrania, o que sugere que o crescimento cerebral possa desacelerar em algum momento após a infância precoce (AYLWARD *et al.*, 2002).

Estudos de neuroimagem convencional têm comprovado que o volume cerebral é aumentado nessas crianças, com crescimento exagerado das substâncias branca e cinzenta, e com padrões anormais de crescimento nos lobos frontais e temporais e estruturas do sistema límbico, como a amígdala. Essas áreas cerebrais estão implicadas no desenvolvimento social, na comunicação e nas habilidades motoras, funções que estão prejudicadas no TEA (SCHULTZ, 2005). O aumento do volume dos lobos frontais tem sido o achado mais consistente (STIGLER *et al.*, 2011).

O cerebelo, historicamente reconhecido como um dos principais responsáveis pela coordenação motora, atualmente é também reconhecido por seu papel na modulação das emoções, da linguagem e das funções executivas (HODGE *et al.*, 2010). Estudos volumétricos do vérmis e de todo o cerebelo foram realizados em indivíduos com TEA. Recentemente, uma metanálise demonstrou diminuição do volume do vérmis nos lobos VI e VII em crianças jovens com autismo (STANFIELD *et al.*, 2008). Ao contrário do vérmis, estudos têm mostrado aumento do volume no restante do cerebelo (STIGLER *et al.*, 2011).

A amígdala possui importante papel na emoção e no comportamento social. Semelhante a outros achados de neuroimagem no autismo, as pesquisas sobre o seu volume ainda são inconsistentes, principalmente por variações fisiológicas que ocorrem nas diferentes idades (STIGLER *et al.*, 2011). O volume da amígdala parece estar aumentado em crianças com autismo menores que 10 anos (SCHUMANN *et al.*, 2004), havendo correlação positiva entre o volume da amígdala e o prejuízo social e comunicativo no grupo autista (SCHUMANN *et*

al., 2009). Em contraste, pesquisas que incluem adolescentes ou adultos, têm encontrado volume da amígdala normal ou menor que em controles, sugerindo que o seu crescimento seja similar ao do restante do cérebro em indivíduos com TEA (STIGLER *et al.*, 2011).

Estudos sugerem diminuição do volume de estruturas possivelmente afetadas no transtorno, como a ínsula anterior, que integra múltiplos sistemas neurocognitivos associados à afetividade e à empatia (KOSAKA *et al.*, 2010); o giro frontal inferior, que atua na memória de trabalho e na comunicação; o córtex cingulado que age na orientação viso-espacial e na memória funcional; e o corpo caloso que facilita a conectividade inter-hemisférica. Não foram encontradas diferenças no volume do tálamo em relação a controles. Esta estrutura está envolvida em múltiplas funções, a linguagem e o processamento das emoções. Estudos para avaliação do hipocampo, do núcleo caudado, da área de Wernicke (planum temporale esquerdo) e do tronco cerebral foram inconclusivos (STIGLER *et al.*, 2011).

Várias pesquisas têm utilizado a ressonância magnética funcional para avaliar resposta a estímulos auditivos e visuais ou em testes cognitivos, com grande contribuição para o entendimento da neurobiologia dos déficits de linguagem e de comunicação. Esses mostram que indivíduos com TEA utilizam estratégias e áreas cerebrais diferentes para processar alguns tipos de informações (BRAMBILLA *et al.*, 2004).

Regiões do córtex frontal, conhecidas como sistema de controle executivo dorsal, estão envolvidas em uma série de operações cognitivas, como planejamento, memória de trabalho, controle de impulsos, inibição e configuração de mudanças, domínios conhecidos como funções executivas. Dano no córtex frontal faz com que o indivíduo perca a capacidade de completar tarefas direcionadas, torne-se impulsivo e apresente comportamentos perseverantes, repetitivos e monótonos, como os encontrados em indivíduos com TEA. Essa semelhança fez com que pesquisadores estudassem as funções executivas nesses indivíduos. Embora tenham sido encontradas muitas alterações, tentativas de se encontrar um padrão “autístico” de

funções executivas formam frustradas, por essas terem sido muito heterogêneas (BRAMBILLA *et al.*, 2004).

Inflexibilidade cognitiva e comportamentos perseverantes podem se dever a uma dificuldade de se desengajar de tarefas prévias após mudanças de paradigmas, possivelmente resultante de uma desconexão com a rede de inibição, composta pelo giro cingulado e pela ínsula, no circuito fronto-parietal. Estudos sugerem que em indivíduos com TEA há uma redução da conectividade funcional entre os lobos frontal e parietal, como entre as áreas associadas ao processamento da linguagem, especialmente as áreas de Broca e de Wernicke, e áreas associadas à integração de informações, como o córtex pré-frontal dorso-lateral (BELGER *et al.*, 2011).

Embora os déficits de interação e de percepção social sejam extensamente documentados em indivíduos com TEA, sabe-se muito pouco sobre suas bases neurológicas. Áreas cerebrais chaves envolvidas nos aspectos da percepção e da cognição social incluem a amígdala, o giro fusiforme e o córtex órbito-frontal, conhecidos como sistema ventral de processamento sócio-afetivo, ativado diferentemente em autistas. Dentre essas estruturas, a amígdala tem papel crucial na interpretação de respostas comportamentais e no reconhecimento das emoções sociais. Recentes estudos *post-mortem* e com imagens funcionais sugerem uma disfunção dessas estruturas em indivíduos com autismo (BELGER *et al.*, 2011). A hipoativação do giro fusiforme em testes de reconhecimento de face tem sido um dos achados mais consistentes (Figura 1), juntamente com anormalidades na ativação da amígdala que pode se relacionar com a pobre fixação do olhar nesses indivíduos (SCHULTZ, 2005). Além disso, exames realizados durante exercícios de imitação têm sugerido menor atividade dos neurônios em espelho no giro frontal inferior (pars opercularis) (DAPRETTO *et al.*, 2006).

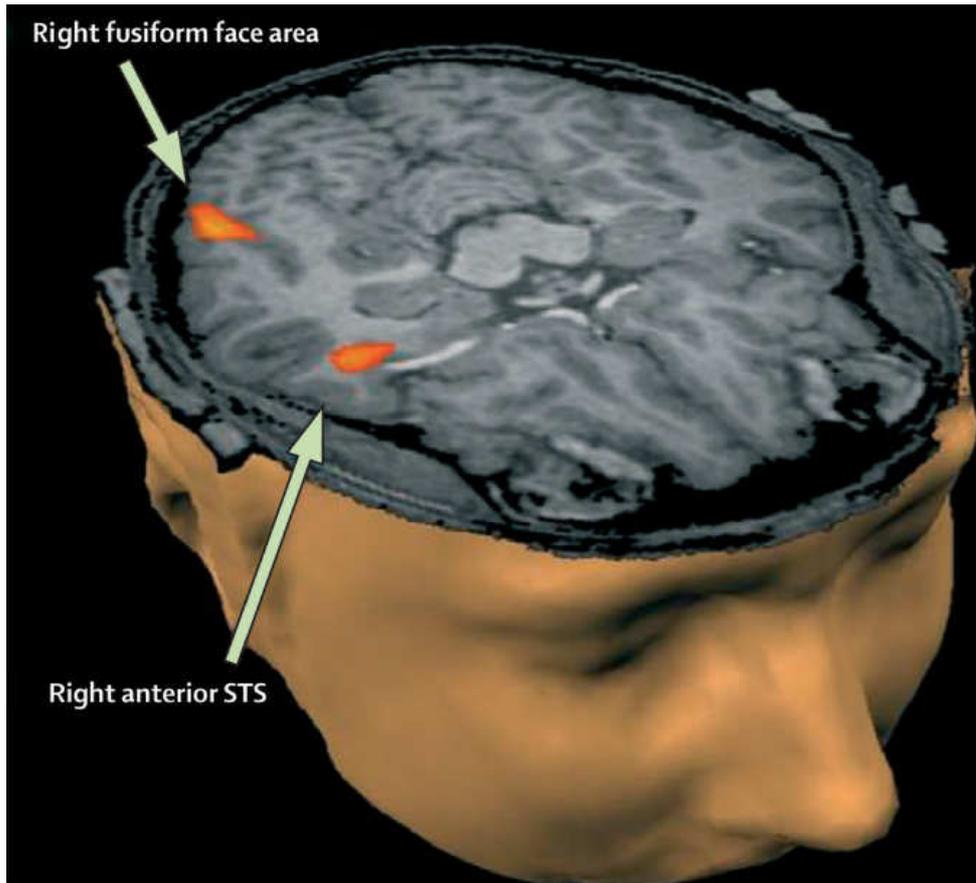


Figura 1 - Imagem de ressonância magnética funcional utilizada para estudar ativação da amígdala, do giro fusiforme e do sulco temporal superior (STS) em resposta a percepção de faces.
 Fonte: LEVY *et al.*, 2009.

A ressonância cerebral funcional também tem contribuído para um melhor entendimento do déficit de linguagem e de comunicação presente no TEA, frequentemente encontrando alterações no giro frontal inferior (área de Broca) e no *planum temporale* esquerdo (área de Wernicke), com diminuição da ativação na primeira e maior ativação na segunda em comparação com controles. Esse padrão sugere que esses indivíduos tenham uma tendência a processos mais extensos de reconhecimento de palavras individuais e de integração a uma estrutura contextual coerente (STIGLER *et al.*, 2011).

Na tabela abaixo são descritas algumas áreas cerebrais que participam de redes neuronais possivelmente associadas ao autismo (Tabela 3).

Tabela 3- Áreas encefálicas envolvidas em redes neuronais possivelmente associadas com autismo

Lobo	Área	Exemplo de disfunção
Lobos frontais	Córtex pré-frontal	Funções executivas, memória de trabalho, atenção
	Área frontal inferior (Brocca)	Linguagem expressiva
	Área motora primária e suplementar	Habilidades motoras
	Córtex frontal orbital	Comportamentos repetitivos, ritualísticos
Lobos temporais	Giro temporal superior e área de Wernicke	Processamento auditivo, compreensão da linguagem
	Giro fusiforme	Reconhecimento facial
	Hipocampo	Memória de curto prazo, aprendizagem verbal e espacial
Lobos parietais	Giro pós-central	Percepção somatosensorial
	Lobo parietal posterior	Imagem corporal, percepções complexas somatosensoriais e espaciais
Lobos occipitais	Córtex visual	Percepção visual
Ínsula	Córtex Insular	Dor, cheiro, gosto, percepções autonômicas
Sistema límbico	Giro cingulado, amígdala, septo, hipotálamo	Emoção, impulso, afeto, medo, agressividade
Cerebelo	Vérnis, hemisférios	Equilíbrio, marcha, coordenação motora e aprendizagem, linguagem, cognição

Fonte: SILVER ; RAPIN, 2012.

A investigação neuroquímica com modelos animais e estudos com drogas permanece inconclusiva. Alterações na serotonina e em seus transportadores podem ter algum papel no desenvolvimento do TEA, assim como os sistemas dopaminérgico, glutamatérgico e colinérgico (LAM *et al.*, 2006). Estudos utilizando tomografia com emissão de pósitrons

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

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

achados, também foram encontrados diminuição de transportadores e de receptores da serotonina em crianças e adultos com autismo (CHUGANI, 2012).

As informações sobre a neuropatologia do autismo são poucas pela escassa quantidade de tecido cerebral disponível para análise. Bauamn e Kemper originalmente encontraram que as células do sistema límbico (hipocampo, amígdala, corpos mamilares, giro anterior do cíngulo e núcleos do septo) eram menores nos cérebros de indivíduos autistas (BAUMAN e KEMPER, 1985), o que levou os autores a postularem um atraso no desenvolvimento maturacional dos circuitos do sistema límbico. No cerebelo identificaram número diminuído de células de Purkinje, sugerindo que as alterações ocorridas nesses cérebros aconteceram ao redor das 30 semanas de gestação (GADIA *et al.*, 2004). Vargas e colaboradores encontraram aumento das células da microglia e de citocinas inflamatórias em alguns casos (VARGAS *et al.*, 2005). Bancos de tecidos *postmortem* têm sido montado com amostras de indivíduos autistas que morreram acidentalmente e com controles. Um dos mais importantes é o *Autism Tissue Program*. Até o momento, nenhum achado neuropatológico específico para o TEA foi encontrado (SILVER e RAPIN, 2012).

2.1.7 Tratamento

Apesar do avanço no diagnóstico precoce e nas intervenções, nenhum tratamento disponível até o momento é capaz de reverter completamente os principais sintomas do TEA. Atualmente, o manejo desses indivíduos é multidisciplinar, com tratamento comportamental, educacional e farmacológico (BENVENUTO *et al.*, 2013; ROSSIGNOL, 2009).

2.1.7.1 Tratamento medicamentoso

A maioria dos medicamentos psicotróficos utilizados em crianças com o TEA são para diminuir uma grande variedade de comportamentos mal-adaptativos, associados ou não a outras condições médicas, que podem interferir profundamente no funcionamento social e na

saúde da criança, além de impedir intervenções não medicamentosas (BENVENUTO *et al.*, 2013).

A utilização de medicações psicotrópicas, sozinhas ou em combinação, deve focar em sintomas específicos e ser utilizada na menor dose efetiva (MCPHEETERS *et al.*, 2011; BENVENUTO *et al.*, 2013). O manejo concomitante de epilepsia pode ser um desafio, já que muitas medicações anti-epilépticas podem causar exacerbação de sintomas comportamentais e algumas medicações psicotrópicas podem baixar o limiar para convulsões (BENVENUTO *et al.*, 2013).

A maioria das medicações utilizadas no TEA são *off-label*, havendo atualmente apenas duas medicações aprovadas pelo *Food and Drug Administration* (FDA), e apenas para comportamentos associados (KAPLAN e MCCRACKEN, 2012). A risperidona foi aprovada em 2006 para tratamento da irritabilidade associada ao TEA, incluindo sintomas de agressividade, manhas, e mudanças rápidas de humor, em idade de 5 a 16 anos, com dose máxima recomendada de 3mg/dia. O aripiprazol foi aprovado em 2009 para os mesmos sintomas, com dose recomendada entre 5 e 15 mg/dia (BENVENUTO *et al.*, 2013; KAPLAN e MCCRACKEN, 2012).

Irritabilidade, auto e hetero-agressividade são sintomas comuns em aproximadamente 68% dos indivíduos autistas (BENVENUTO *et al.*, 2013). Neurolépticos convencionais como o haloperidol têm sido utilizados para tratar esses sintomas, mas a sedação e seus importantes efeitos adversos, incluindo distonia aguda e discinesia tardia, são frequentemente inaceitáveis e limitam sua utilização em pacientes pediátricos. Antipsicóticos atípicos parecem ser melhores no tratamento dos sintomas disruptivos. Atualmente, a risperidona (RESEARCH UNITS ON PEDIATRIC PSYCHOPHARMACOLOGY AUTISM NETWORK, 2002) e o aripiprazol (MARCUS *et al.*, 2009; OWEN *et al.*, 2009) são os únicos anti-psicóticos de segunda geração que têm mostrado diminuição desses sintomas em estudos grandes,

controlados e duplo-cegos. Estudos pequenos, abertos sugerem benefícios com outros antipsicóticos como olanzapina, clozapina e ziprazidona.

O uso de anticonvulsivos tem aumentado no tratamento dos sintomas disruptivos, principalmente na presença de epilepsia. O divalproato de sódio tem se mostrado efetivo não apenas em melhorar esses sintomas, mas também nos comportamentos repetitivos, na sociabilidade e na instabilidade de humor. Tratamento adjunto com topiramato pode ser superior à risperidona no tratamento da irritabilidade e de sintomas disruptivos graves, além de melhorar a hiperatividade e a atenção. *Trials* controlados e randomizados sugerem que o levotiracetam e a lamotrigina não melhoram os sintomas comportamentais do TEA (KAPLAN e MCCRACKEN, 2012).

Sintomas de hiperatividade, impulsividade e desatenção são frequentemente associados ao autismo. Psicoestimulantes e outras medicações utilizadas em crianças típicas para Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH) têm sido opções terapêuticas em pacientes autistas (KAPLAN e MCCRACKEN, 2012). O metilfenidato foi o psicoestimulante mais estudado, com resultados razoáveis. Porém, seu efeito nesses pacientes é bem menor que o observado em crianças típicas, e deve ser utilizado inicialmente em doses baixas, já que essas crianças são mais susceptíveis a efeitos adversos e apresentam respostas variáveis (RESEARCH UNITS ON PEDIATRIC PSYCHOPHARMACOLOGY AUTISM NETWORK, 2005).

Comportamentos perseverantes e repetitivos são muito comuns em indivíduos com TEA. Terapia comportamental é o tratamento de primeira linha para esses sintomas, que podem ser de muito difícil manejo. Nesses casos, tratamento farmacológico é frequentemente indicado. Antidepressivos, principalmente os inibidores da recaptação da serotonina, estão entre as medicações mais utilizadas para esses sintomas. Embora seus benefícios sejam descritos em vários estudos de casos ou estudos não controlados, o baixo número de *trials*

controlados e randomizados de boa qualidade limitam as evidências de que essas medicações diminuam comportamentos repetitivos (BENVENUTO *et al.*, 2013; KAPLAN e MCCRACKEN, 2012). O divalproato de sódio foi efetivo em reduzir comportamentos repetitivos em um pequeno *trial* controlado por placebo (HOLLANDER, 2006). Os estudos mostram que a resposta dos comportamentos repetitivos ao tratamento medicamentoso é muito restrita, e deve ser indicado apenas se houver associação com ansiedade ou se forem muito graves (KAPLAN e MCCRACKER, 2012).

Os distúrbios do sono são mais frequentes em crianças autistas (43-83%). O tratamento medicamentoso é indicado apenas nos casos de falha do tratamento psicossocial. A administração de melatonina nesses pacientes é segura, bem tolerada e eficiente em melhorar o padrão do sono (MALOW *et al.*, 2012).

2.1.7.2 Tratamento não medicamentoso

Os programas de tratamento não medicamentoso para pacientes com TEA trazem melhoras nos sintomas-chaves do espectro, e podem melhorar muito a qualidade de vida do paciente e de sua família. Devem ser multidisciplinares e adaptados às necessidades de cada indivíduo. Os objetivos desses tratamentos são maximizar o funcionamento e fazer com que a criança adquira maior grau de independência. Eles incluem terapias comportamentais e educacionais, acompanhamento fonoaudiológico e psicopedagógico, terapia ocupacional, entre outros.

As terapias comportamentais e educacionais são os componentes principais dos programas de tratamento de crianças autistas (MYERS e JOHNSON, 2007). Revisões sistemáticas e pequenos *trials* têm demonstrado que elas melhoram os principais sintomas do TEA (comportamento repetitivo, linguagem e interação social) e o coeficiente de inteligência (QI) (LEBLANC e GILLIS, 2012), sendo as melhores respostas obtidas em pacientes que apresentam atenção compartilhada, habilidade funcional para brincar, boa capacidade

cognitiva e sintomas autistas de menor gravidade (SIGMAN e MCGOVERN, 2005). No momento, o único tratamento psicoeducacional que apresenta critérios bem estabelecidos de eficácia é a terapia comportamental. Dentre os modelos intervencionistas, os principais são *Applied Behavior Analysis (ABA)*, *Treatment and Educacional of Autistic and Related Communication-Handicapped Children (TEACCH)* e *Developmental Individual Difference Relations-Ship-Based Approach (Floortime)*. Embora os modelos de intervenção intensa possam melhorar muito os sintomas chave do TEA, não se deve esperar que essas crianças consigam atingir um funcionamento normal (WARREN *et al.*, 2011). Nas terapias comportamentais não intervencionistas destaca-se o método PECS (*Picture Exchange Communication System*), que é um sistema de comunicação funcional, utilizando figuras. Esse modelo ajuda autistas não verbais ou com linguagem deficitária a se comunicar, diminuindo a frustração causada pelo déficit de comunicação. Estudos avaliando sua eficácia o consideram um método promissor (GANZ *et al.*, 2012), assim como a musicoterapia (KIM *et al.*, 2008).

2.1.8 Prognóstico

Os mais importantes fatores determinantes de prognóstico parecem ser os testes de funcionamento intelectual realizados na infância e escores de QI, que tendem a permanecer relativamente estáveis com o passar do tempo. Enquanto que estudos prévios mostravam melhores desfechos com QI superior a 50, outro estudo encontrou que apenas indivíduos autistas com QI superior a 70 tinham melhor prognóstico (HOWLIN *et al.*, 2004). No entanto, mesmo nesse grupo de indivíduos, os desfechos eram muito variáveis, pois os déficits fundamentais do autismo, principalmente rituais e comportamentos estereotipados, podem prejudicar o melhor desempenho esperado pelo QI maior (HOWLIN *et al.* 2000; HOWLIN *et al.* 2004). O desfecho também parece ser pior naqueles que falham em adquirir linguagem funcional até próximo a idade de 6 anos (HOWLIN *et al.*, 2004).

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

A taxa de vida independente em indivíduos com autismo varia conforme a pesquisa, ficando entre 15 a 25% (ANAGNOSTOU e SHEVELL, 2009).

2.2 PEPTÍDEOS

2.2.1 Considerações Gerais

Os aminoácidos são unidos por pontes peptídicas para formar polímeros, constituindo peptídeos ou proteínas. Peptídeos geralmente possuem menos de 40 aminoácidos, enquanto que as proteínas podem ter 50 ou mais. O peso molecular também é utilizado para a definição. São considerados peptídeos os polímeros com peso inferior a 5000 Da e proteínas aqueles com peso maior. Por esta definição, a insulina é a menor proteína disponível, com peso molecular de 5800 Da (DEGIM e CELEBI, 2007).

Alguns peptídeos, conhecidos como neuropeptídeos, são pequenas moléculas regulatórias distribuídas principalmente nos sistemas nervoso, gastrointestinal e cardiovascular. Esses estão envolvidos em diversas funções, como a regulação do funcionamento neuronal, do balanço de fluidos, da pressão arterial, da digestão e da resposta alérgica. Podem atuar como neurotransmissores, estando frequentemente presentes nos neurônios (CLIVE *et al.*, 2001).

2.2.2 Aplicações Terapêuticas

Muitos peptídeos têm sido usados como medicamentos desde a introdução comercial da insulina, do hormônio tireoidiano e do fator VIII, entre 1920 e 1930. Apesar de os peptídeos

serem utilizados para tratamento de um grande número de doenças, ainda são considerados principalmente reguladores moleculares de muitos processos fisiológicos (PASHA e GUPTA, 2010). A Tabela 4 lista alguns peptídeos e proteínas em fase de desenvolvimento clínico ou já comercializados (DEGIM e CELEBI, 2007).

Tabela 4 - Exemplos e aplicações de peptídeos e proteínas em uso clínico ou em fase de desenvolvimento

Peptídeos ou proteínas terapêuticos	Aplicação
Fator de necrose tecidual	Carcinoma
Proleucina	Carcinoma
γ- Interferon	Carcinoma
Hormônio liberador da gonadotrofina (GnRH)	Reprodução
Fator de crescimento de fibroblastos	Cicatrização de feridas
Fator de crescimento semelhante à insulina	Cicatrização de feridas
Fator de crescimento epidérmico	Cicatrização de feridas
Hirudina	Fibrinolítico
Estreptoquinase	Fibrinolítico
Eritropoetina	Eritropoiese
Fator VIII	Hemofilia
Fator IX	Doença de Christmas
Tripoamilina	Regulação da glicose
Insulina	Regulação da glicose
Somatostatina	Regulação da glicose
Proinsulina	Regulação da glicose
Vasopressina	Anti-diurético
α- Interferon	Antiviral / leucemia de células pilosas
β-Interferon	Esclerose Múltipla
Glucocerebrosidase	Doença de Gaucher
Cerezyme	Doença de Gaucher Tipo I
Pulmozyme	Fibrose Cística
Calcitonina	Doenças ósseas
Oxitocina	Indução do parto
Hormônio do crescimento	Baixa estatura
α-1 Antitripsina	Deficiência de α -1 Antitripsina
Superóxido dismutase	Doenças respiratórias

Fonte: DEGIM e CELEBI, 2007.

Os peptídeos e as proteínas têm se tornado importantes alvos das indústrias farmacêuticas que visam desenvolver medicações para uma grande variedade de doenças neurológicas, como isquemia, doenças inflamatórias do SNC, doenças neurodegenerativas e síndromes dolorosas agudas ou crônicas (MALATOVA e CABRAL, 2011). Concomitante às pesquisas clínicas, estudos também têm sido feitos para um melhor entendimento do seu funcionamento (PASHA e GUPTA, 2010).

Os peptídeos possuem uma série de vantagens como moléculas terapêuticas. Os hormônios peptídicos endógenos desenvolvem, por natureza, a regulação de funções muito

específicas e complexas. Em geral, possuem alta especificidade pela ligação a receptores específicos, são muito potentes e com mínima reatividade cruzada. Ao contrário de outras moléculas terapêuticas muito pequenas, não se acumulam nos tecidos e são eficientemente metabolizados por enzimas endógenas. Interagem muito pouco com outras drogas e, com exceção de algumas reações imunes, tipicamente são livres de complicações toxicológicas e possuem mínimos efeitos adversos (MCGONIGLE, 2012).

Infelizmente, há muitos desafios que devem ser superados para que os peptídeos se tornem viáveis como moléculas terapêuticas. Uma das principais limitações é a meia-vida curta *in vivo*. Muitos peptídeos são depurados da corrente sanguínea dentro de poucos minutos a algumas horas após a sua administração, resultando em exposição insuficiente aos tecidos alvos. A meia vida curta resulta tipicamente do rápido *clearance* renal e da digestão enzimática por proteases presentes no sangue, fígado e rim (MCGONIGLE, 2012). Outra limitação prática é a incapacidade de uso pela via oral devido à absorção pobre e a alta degradação enzimática. A liberação dessas moléculas por rotas não invasivas alternativas tem sido muito estudada, e os esforços para o desenvolvimento de rotas por via sublingual, nasal, retal, vaginal ou pulmonar têm sido descritos na literatura (MALATOVA e CABRAL, 2011).

Em indicações para o SNC, outro grande desafio é a penetração através da barreira hemato-encefálica (BHE). Em geral, os peptídeos não a atravessam, mas há peptídeos endógenos como a insulina e a leptina que entram até o cérebro através de transportadores específicos. Transportadores específicos para levar os peptídeos até o cérebro já estão sendo desenvolvidos (MCGONIGLE, 2012).

Na Tabela 5, estão resumidas as vantagens e as desvantagens dos tratamentos com peptídeos.

Tabela 5 - Vantagens e desvantagens do tratamento com peptídeos

Vantagens	Desvantagens
Alta especificidade	Via de administração
Alta potência	Pobre penetração a BHE*
Mínimos efeitos cruzados	Manufatura complexa
Sem acúmulo tecidual	Baixa estabilidade química
Metabolismo eficiente	Tamanho das moléculas
Pouca interação medicamentosa	Custo da manufatura
Mínimos efeitos adversos	
Baixa imunogenicidade	
Pode ser sintetizado	

*BHE: Barreira hemato-encefálica

Fonte: MCGONIGLE, 2012.

2.2.3 Peptídeos e o SNC

Nas últimas décadas, tem havido avanços consideráveis no entendimento dos mecanismos envolvidos nas patologias que afetam o SNC e no seu tratamento. O cérebro, por ser o principal órgão regulador do organismo humano, tem sido alvo de muitos estudos para o desenvolvimento de novos neurofármacos.

Peptídeos, proteínas e seus receptores estão presentes em todas as partes do sistema nervoso, com diferentes padrões de distribuição. Muitas evidências indicam que eles exercem múltiplas ações biológicas no cérebro, como neurotransmissão, neuromodulação, regulação dos sistemas endócrino e imunológico, da produção do líquido, da permeabilidade da BHE aos nutrientes, além da regulação de funções intrínsecas (MALATOVA e CABRAL, 2011).

Os primeiros estudos sobre o funcionamento fisiológico de peptídeos e proteínas no SNC avaliaram o efeito da dinorfina sobre o hipocampo. Trabalhos com esse peptídeo opióide demonstraram sua capacidade de bloquear a potencialização de longo prazo via receptores opióides kappa (WEISSKOPF *et al.*, 1993). Desde então, vários peptídeos com ação sobre o SNC já foram estudados, como:

2.2.3.1 Neurotensina

A neurotensina é um tridecapeptídeo encontrado no trato gastrointestinal (TGI), no sistema cardiovascular e no SNC. Ela participa do controle da pressão arterial, do apetite e da temperatura corporal. No SNC seus receptores são encontrados em altas concentrações na amígdala, no septo lateral, na substância nigra e na área do tegmento ventral. Há associação com o sistema dopaminérgico mesocortical e nigroestriatal, com 80% dos neurônios dopaminérgicos do tegmento ventral expressando seus receptores, o que levou a estudos com a neurotensina em transtornos psiquiátricos. Estudos pré-clínicos demonstraram que a administração central de neurotensina tem efeitos comportamentais semelhantes ao uso periférico de drogas antipsicóticas. Antipsicóticos típicos e atípicos aumentam a sua expressão de RNAm e a sua concentração. Esses resultados têm sugerido que a neurotensina atue como um antipsicótico endógeno e levado ao desenvolvimento de agonistas para o tratamento da esquizofrenia (MCGONIGLE, 2012). Nenhum *trial* clínico testou essa hipótese até o momento.

2.2.3.2 Colecistoquinina

A colecistoquinina é um peptídeo com 33 aminoácidos encontrado no SNC e periférico e no TGI. Atua como um sinalizador endógeno de saciedade. Um de seus receptores é expresso no cérebro com altas concentrações no córtex, nos núcleos caudado e accumbens, hipocampo, amígdala, substância nigra e área do tegmento ventral. Possui efeitos significativos nos comportamentos mediados pelo sistema dopaminérgico. Sua administração gera alterações de comportamento semelhantes aos dos antipsicóticos, incluindo a resposta de evitação condicionada, a inibição de comportamentos estereotipados e a inquietação motora (MCGONIGLE, 2012). Em todos os estudos clínicos a administração foi sistêmica. Embora

alguns estudos tenham mostrado resultados promissores, nos estudos duplo-cegos não foram encontradas diferenças em relação ao placebo (MONTGOMERY e GREEN, 1988).

2.2.3.3 Neuropeptídeo Y

O neuropeptídeo Y é um dos peptídeos mais abundantes no cérebro. Possui 36 aminoácidos e participa da regulação de vários processos fisiológicos, como ingestão de alimentos, cognição, aprendizagem, sensibilidade ao estresse e humor. Altos níveis de neuropeptídeo são encontrados no locus cerúleos, no hipotálamo, na amígdala, no hipocampo, no núcleo accumbens e no córtex. Há muitos dados pré-clínicos reforçando seu papel na resposta ao estresse, na ansiedade e na depressão. Há várias publicações relatando diminuição desse peptídeo no líquido e no sangue de indivíduos que sofrem de depressão maior, mas esses achados não são universais. Seu potencial terapêutico ainda não foi testado em humanos (MCGONIGLE, 2012).

2.2.3.4 Amilina

A amilina é um peptídeo hormônio de 37 aminoácidos secretado juntamente com a insulina pelas células β pancreáticas e cujo principal papel metabólico é reduzir a entrada de glicose na corrente sanguínea. Seus receptores específicos são expressos no núcleo accumbens, núcleo dorsal e área postrema (MCGONIGLE, 2012). Ela tem sido estudada para tratamento do diabetes e da obesidade, mas estudos pré-clínicos sugerem que ela possa ter potencial terapêutico em distúrbios psiquiátricos que envolvam o estresse. A administração sistêmica de amilina parece ser efetiva em vários testes comportamentais para atividade antidepressiva ou ansiolítica (ROTH *et al.*, 2009).

2.2.3.5 Neurotrofinas

As neurotrofinas são agentes peptídicos e/ou proteicos potenciais para o tratamento de doenças neurodegenerativas, como a Doença de Alzheimer, a Doença de Parkinson e a Atrofia Lateral Amiotrófica. Há fortes evidências de que a diminuição das neurotrofinas tenha um papel significativo na patogênese dessas doenças (CAPSONI *et al.*, 2002). Porém, os estudos com peptídeos nas doenças neurodegenerativas têm sido desapontadores em reverter ou prevenir danos aos SNC, o que pode ser causado pela dificuldade dos peptídeos em atravessarem a BHE (BRANSJEVIC *et al.*, 2009).

2.2.3.6 Secretina

A secretina é um polipeptídeo gastrointestinal usado na evolução da função pancreática e diagnóstico de pancreatite. Resultados de estudos de modelo animal têm sugerido que ela também atue no SNC e possa agir como neurotransmissor (KRISHNASWAMI *et al.*, 2011). Em 1998 surgiu interesse nesse peptídeo como possível tratamento para TEA, após ter sido notada melhora social, cognitiva e comunicativa em três crianças autistas que receberam secretina endovenosa durante endoscopia de rotina para evolução de problemas gastrointestinais. Esses resultados foram novamente obtidos com reaplicação da secretina nessas crianças semanas após (HORVATH *et al.*, 1998). Desde então, surgiu um grande número de estudos com secretina intravenosa em indivíduos autistas, porém estudos grandes e recentes, como a revisão sistemática realizada por Krishnaswami e colaboradores (KRISHNASWAMI *et al.*, 2011) e a metanálise realizada por Williams e colaboradores (WILLIAMS *et al.*, 2012) mostram, de maneira uniforme, que não há melhora significativa nos sintomas do TEA com o uso de secretina.

2.2.3.7 Oxitocina e vasopressina

A oxitocina e a vasopressina, conhecidos como “peptídeos do amor e do medo” ou “neuropeptídeos sociais”, além de classicamente atuarem na amamentação, no trabalho de parto e no controle da pressão arterial, também estão implicados em comportamentos sexuais, reconhecimento social e resposta ao estresse. Esses hormônios parecem ser essenciais para as interações sociais, exercendo papel importante nos cuidados maternos e nos relacionamentos mais próximos, gerando confiança, cooperação e aumento da memória social. Eles também exercem papel importante na modulação do medo e da resposta à ansiedade, principalmente pela regulação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e da atividade da amígdala, com efeito sobre o hipotálamo e o restante do sistema nervoso (WÓJCIAK *et al.*, 2012).

A oxitocina é um nanapeptídeo sintetizado nos núcleos paraventricular e supraóptico do hipotálamo, transportada para a hipófise posterior e então liberada para a circulação. O núcleo paraventricular também libera oxitocina para a amígdala, o hipotálamo, o hipocampo e o núcleo accumbens, nos quais provavelmente exerça seu efeito comportamental (MCGONIGLE, 2012). Em humanos, altos índices de receptores para oxitocina são encontrados na área de Broca, no septo lateral, no hipotálamo e na substância nigra. A oxitocina sintética (Pitocin[®]) é utilizada para indução do trabalho de parto e produção de leite.

Estudos de modelo animal têm demonstrado que a oxitocina exerce efeito semelhante aos dos medicamentos antidepressivos, e pesquisas com a administração de oxitocina intranasal em adultos saudáveis têm encontrado efeitos positivos, como o aumento da precisão no processamento emocional (SIMPLICIO *et al.*, 2009), da confiança (KOSFELD *et al.*, 2005) e do olhar para a região dos olhos em faces humanas (GUASTELLA *et al.*, 2008). Estudos clínicos sugerem que ela possa ser uma droga promissora em doenças psiquiátricas como depressão, transtornos de ansiedade, esquizofrenia, fobia social e autismo, mesmo não

ultrapassando facilmente a BHE (MATSUZAKI *et al.*, 2012). Os resultados desses estudos ainda são preliminares.

Há evidências de que o sistema envolvendo a oxitocina possa estar alterado no autismo. Polimorfismos comuns e a metilação epigenética da região promotora do gene do receptor da oxitocina estão associados a um maior risco de autismo (GREGORY *et al.*, 2009). Além disso, crianças com TEA apresentam menor nível plasmático de oxitocina (MODAHL *et al.*, 1998) e maiores níveis de seus peptídeos precursores em relação a controles (GREEN *et al.*, 2001), embora esses resultados não sejam replicáveis em adultos jovens com o transtorno (MILLER *et al.*, 2013).

Considerando as evidências da importância da oxitocina no comportamento social, uma das áreas mais afetadas no TEA, e da possível redução do funcionamento oxitocinérgico em indivíduos autistas, muitos pesquisadores têm proposto um papel para a oxitocina no tratamento farmacológico desse transtorno. Vários estudos têm avaliado o possível efeito da oxitocina intranasal e endovenosa nesses indivíduos, com resultados positivos, como redução dos comportamentos repetitivos (HOLLANDER *et al.*, 2003), aumento da memória social (HOLLANDER *et al.*, 2007) e do processamento emocional (GUASTELLA *et al.*, 2010). Porém, são estudos com amostras pequenas e objetivando avaliar efeitos comportamentais e cognitivos específicos, sendo necessário *trials* maiores. Recentemente, um *trial* duplo-cego, randomizado e controlado por placebo, com 38 autistas do sexo masculino com idade entre 7 e 16 anos, não encontrou melhora significativa no reconhecimento emocional, na interação social e no ajustamento comportamental, mostrando que os benefícios da oxitocina intranasal em indivíduos jovens com autismo possa ser menor que o sugerido em estudos prévios (DADDS *et al.*, 2013).

2.2.4 Peptídeo liberador de gastrina

O GRP é um neuropeptídeo formado por 27 aminoácidos, sintetizado inicialmente na forma de um precursor bem maior, o PreproGRP, com 148 aminoácidos, posteriormente metabolizado (SPINDEL *et al.*, 1990). Recebeu este nome por ter sido primeiramente isolado de tecidos gástricos e ser potente indutor da liberação de gastrina (GONZALES *et al.*, 2008).

O GRP, juntamente com a neuromedina B, são os homólogo mamíferos do peptídeo bombesina (BB), isolado da pele de sapos europeus da espécie *Bombina bombina* em 1970 (ERSPAMER *et al.*, 1970). O GRP e a bombesina apresentam atividades biológicas semelhantes e mostram a mesma sequencia terminal de 7 aminoácidos (ROESLER e SCHWARTSMANN, 2012). Os primeiros experimentos examinando o efeito da bombesina foram feitos por Brown e colaboradores em 1977, mostrando que a sua administração cerebral em ratos induz a hipotermia e hiperglicemia (BROWN *et al.*, 1977a,b). Desde então vários outros estudos foram realizados, sendo atribuídas várias outras funções ao GRP.

Em condições fisiológicas, o GRP é encontrado no plasma humano em concentrações próximas a 15pmol/L (40ng/L) (CLIVE *et al.*, 2001).

O GRP atua através da ligação a receptores específicos (GRPR, também chamados BB2). Esses receptores acoplam-se a proteínas G que contém sete domínios transmembrana e 384 aminoácidos (Figura 2), e é capaz de mediar as ações dos peptídeos BB e GRP. O gene do GRPR em humanos está localizado no cromossoma 18q21 (GONZALES *et al.*, 2008).

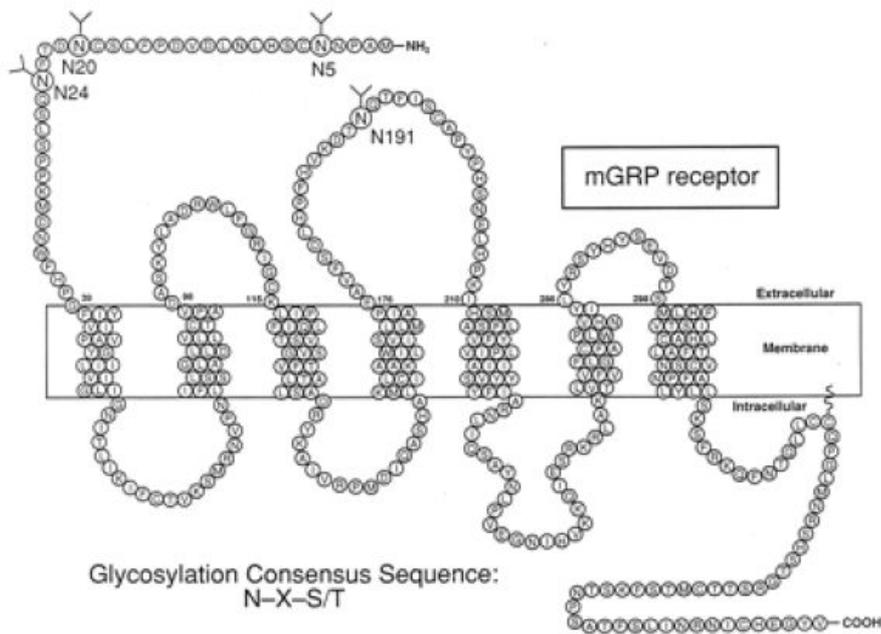


Figura 2 - Estrutura molecular do GRPR
Fonte: Adaptado de CARROLL *et al.*, 2000

Os peptídeos da família bombesina encontram-se largamente distribuídos no SNC e nos tecidos periféricos, especialmente no TGI (GONZALES *et al.*, 2008). Estudos *in vitro* indicam que há áreas do SNC de mamíferos com alta densidade de receptores para GRP, como bulbo olfatório, núcleo accumbens, núcleo caudado, putamen, amígdala central, hipocampo dorsal, áreas paraventricular, central medial e paracentral do núcleo talâmico, hipotálamo, tronco cerebral e núcleo do tracto solitário (MOODY *et al.*, 2004; ROESLER e SCHWARTSMANN, 2012). Estudo realizado por Kamichi e colaboradores mostrou que o GRPR se expressa apenas no corpo neuronal e dendritos, não estando presente nos axônios, sugerindo que o GRP atue regulando a transmissão sináptica (KAMICHI *et al.*, 2005). Além do SNC e do TGI, esses receptores são expressos em células de diversas regiões do corpo, como sistema nervoso periférico, útero, pulmão, bexiga e são expressos de forma aberrante em células tumorais.

2.2.4.1 Ações do GRP nos tecidos periféricos

Estudos *in vivo* utilizando modelos animais têm demonstrado que o GRP regula várias funções fisiológicas. Nos tecidos periféricos, tem importantes funções no TGI, onde é liberado pelos neurônios enterais e regula a liberação dos hormônios gastrina, insulina, glucagon, polipeptídeo pancreático, colecistoquinina, somatostatina, motilina, peptídeo vasoativo intestinal e enteroglucagon (CLIVE *et al.*, 2001). Nesse trato e no urogenital atua na musculatura lisa com importantes efeitos na motilidade e no peristaltismo (GONZALES *et al.*, 2008).

O GRP apresenta efeito local vasodilatador (CLIVE *et al.*, 2001) e estudos também sugerem que exerça importantes efeitos sobre o sistema imunológico, participando da patogênese de doenças inflamatórias. Macrófagos ativados secretam GRP e GRPR são expressos em linfócitos, neutrófilos, eosinófilos, macrófagos e células endoteliais. A administração do antagonista do GRPR em modelo animal de sepse atenuou a liberação de citocinas pró-inflamatórias, sugerindo uma nova via inflamatória relevante no desenvolvimento da sepse (DAL-PIZZOL *et al.*, 2006). Recentemente, os efeitos desses peptídeos na produção e liberação de citocinas inflamatórias têm sido descritas em modelos animais e humanos de doenças inflamatórias. Algumas condições patológicas como exposição ao fumo, doença pulmonar obstrutiva crônica e granuloma esinofílico foram associados ao aumento da produção de peptídeos da família bombesina pelas células pulmonares e estudos sugerem que neuropeptídeos pró-inflamatórios podem ser a chave na patogênese e na manutenção da artrite reumatóide e da sepse. Esses dados suportam que o GRPR deve ser considerado um alvo terapêutico nas doenças inflamatórias (PETRONILHO *et al.*, 2007).

O GRP atua como fator de crescimento para células normais e tumorais que expressam seu receptor, como os tumores de pulmão, próstata, pâncreas, ovário, mama, intestino e glioblastomas. Desde essa descoberta, o GRPR tem sido testado como possível alvo

terapêutico específico para esses tumores e antagonistas desse receptor têm sido desenvolvidos como potenciais agentes antitumorais, como o RC-3095, que tem demonstrado resultados promissores em estudo *in vitro*, *in vivo* e clínicos de fase I (SCHWARTSMANN *et al.*, 2005; CORNELIO *et al.*, 2007).

Além dessas áreas, estudos recentes também sugerem que o GRP possa ter um importante papel no tratamento do prurido crônico e no desenvolvimento de doenças pulmonares, como a displasia broncopulmonar e a fibrose (GONZALES *et al.*, 2008).

2.2.4.2 Ações do GRP no sistema nervoso central

Os peptídeos da família bombesina apresentam importantes efeitos no SNC, como a regulação do ritmo circadiano, da temperatura corporal, da ansiedade, da saciedade e de vários outros comportamentos (GONZALES *et al.*, 2008). Eles ativam o sistema nervoso simpático e parecem modular o estresse, o medo e a resposta à ansiedade (MOODY *et al.*, 2004).

2.2.4.2.1 Plasticidade sináptica e memória

Estudos farmacológicos de modelo animal avaliaram o possível efeito do GRP e de seus receptores na memória. A administração sistêmica ou cerebral de bombesina ou de GRP facilita a consolidação da memória, efeito que é particularmente importante na presença de fatores emocionais e medo, enquanto que injeções de antagonistas de GRPR prejudicam a sua retenção em ratos e camundongos (ROESLER e SCHWARTSMANN, 2012). Esses achados são suportados por estudos genéticos que mostram alterações tanto na formação da memória quanto na plasticidade sináptica em camundongos transgênicos deficientes de GRPR (SHUMYASTSKY *et al.*, 2002). Embora estudos adicionais sejam necessários para esclarecer o papel exato do GRPR na regulação da memória, as evidências suportam que ele esteja entre os diversos sistemas de receptores neuronais que participam da formação da memória e que

possa ser alvo terapêutico para doenças neurológicas, como a Doença de Alzheimer (ROESLER e SCHWARTSMANN, 2012).

2.2.4.2.2 *Comportamento emocional*

O GRP e seu receptor são expressos em grande quantidade em algumas áreas do sistema nervoso central, como a amígdala, que é ativada por estímulos estressantes. Estudos mostram que a exposição crônica a eventos estressores leva a um aumento dos níveis de GRP na hipófise anterior (MERALI *et al.*, 2009) e que há uma maior liberação de GRP na amígdala de ratos após eventos estressores agudos, como o choque (MERALI *et al.*, 2002). O GRP parece estimular a liberação de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) em situações de estresse, aumentando a atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal. A sua administração induz a efeitos endócrinos, autonômicos e comportamentais associados ao estresse, enquanto que o antagonista do seu receptor atenua essas respostas (ROESLER e SCHWARTSMANN, 2012). Além disso, Martins e colaboradores mostraram que administração sistêmica do antagonista do GRPR pode ter efeito ansiogênico em teste de labirinto em ratos (MARTINS *et al.*, 2005).

2.2.4.2.3 *Comportamento alimentar*

Há mais de 30 anos foi reconhecido que a administração sistêmica ou intracerebral de bombesina ou GRP diminui a ingestão alimentar em ratos (GIBBS *et al.*, 1981). Os GRPR centrais são críticos para essa regulação e a amígdala é provavelmente uma das áreas centrais chaves. A infusão bilateral de GRP na amígdala central produz uma inibição transitória da alimentação, efeito que é inibido pelo seu antagonista (FEKETE *et al.*, 2002). Gutzwiller e colaboradores encontraram redução da ingestão de calorias em adultos saudáveis com a administração endovenosa de GRP (GUTZWILLER *et al.*, 1994).

2.2.4.2.4 *Comportamento sexual*

Recentemente foi descoberto que o GRP pode participar da regulação das funções sexuais masculinas. Em ratos machos sem disfunção do gene do receptor de andrógenos, GRP contido em neurônios da medula espinhal lombar controlam a ereção e a ejaculação (SAKAMOTO *et al.*, 2008). Os estudos sugerem que esses GRPR sejam regulados pelos hormônios androgênicos, já que a estimulação farmacológica desses receptores restaura os reflexos penianos e a ejaculação após castração (SAKAMOTO *et al.*, 2009). Assim, o GRPR tem sido estudado na patogênese da disfunção erétil psicogênia e como possível alvo terapêutico (ROESLER e SCHWARTSMANN, 2012).

2.2.4.2.5 *Patogênese de doenças neuropsiquiátricas*

Como o GRP é altamente expresso em neurônios de áreas cerebrais como o hipocampo e a amígdala e tem papel importante na regulação de comportamentos que podem estar alterados em indivíduos com desordens do SNC, é possível que um desequilíbrio na sinalização dos GRPR contribua para a patogênese de doenças neurológicas e psiquiátricas. Embora não se tenha estabelecido uma relação causal direta dos GRPR com doenças do SNC, alterações nos níveis de GRP, na densidade dos GRPR ou no seu funcionamento têm sido descritos em pacientes com doenças psiquiátricas, neurodegenerativas ou do neurodesenvolvimento (ROESLER e SCHWARTSMANN, 2012). Estudos em roedores mostram que os GRPR participam da regulação de comportamentos como auto-limpeza, ingestão de alimentos, estereotípias, comportamento social, aprendizagem e memória associadas à emoção. Juntos, esses achados suportam que os GRPR devam ser considerados possíveis alvos terapêuticos para doenças do SNC (ROESLER *et al.*, 2006a).

Dentre as doenças neurodegenerativas, na doença de Parkinson foi encontrada diminuição da concentração de peptídeos da família bombesina no núcleo caudado e no globo

pálido (BISSETTE *et al.*, 1985) e na doença de Alzheimer diminuição da densidade do GRPR e da sinalização da bombesina induzida pelo cálcio em fibroblastos (GIBSON *et al.*, 1997). Roesler e colaboradores usaram o déficit de memória induzido por microinfusões de baixa dose do peptídeo beta-amilóide (25-35; Abeta) no hipocampo dorsal de ratos como modelo da perda de memória associada à doença de Alzheimer e demonstraram que a infusão intra-hipocampal de bombesina preveniu completamente o prejuízo na memória inibitória nesses animais (ROESLER *et al.*, 2006b). Esta foi a primeira evidência pré-clínica de que a estimulação farmacológica do GRPR pode melhorar o déficit de memória associado à Doença de Alzheimer.

Dentre as doenças psiquiátricas, estudos sugerem que o GRP possa estar envolvido na patogênese da esquizofrenia, da mania e dos transtornos da ansiedade. Foi descrito diminuição dos níveis de bombesina no líquido de pacientes com esquizofrenia (GERNER *et al.*, 1985) e que o bloqueio dos GRPR através de injeções sistêmicas de RC-3095 previne o surgimento de estereotipias induzidas por apomorfina e de hiperlocomoção induzida por anfetaminas em ratos, que são modelos animais de esquizofrenia e mania, respectivamente (MELLER *et al.*, 2004; KAUER-SANT'ANNA *et al.*, 2007).

Evidências pré-clínicas indicam que os GRPR também sejam um importante alvo terapêutico potencial para o tratamento dos transtornos da ansiedade. Muitos estudos têm sugerido que os peptídeos da família bombesina e seus receptores mediam a ansiedade, a resposta ao estresse e a memória associada ao medo. Áreas do sistema límbico como o hipocampo e a amígdala, importantes na patogênese desses comportamentos, possuem alta densidade de GRPR (ROESLER *et al.*, 2004). A estimulação farmacológica de GRPR no hipocampo leva a extinção e a reconsolidação da memória associada ao medo, modelo pré-clínico utilizado nas pesquisas envolvendo transtorno de estresse pós-traumático (LUFT *et al.*, 2008). Como já citado anteriormente, eventos estressores crônicos ou agudos aumentam a

liberação de GRP na hipófise anterior e na amígdala, respectivamente (MERALI *et al.*, 2009; MERALI *et al.*, 2002) e a administração do antagonista do GRPR pode induzir a efeito semelhante ao das medicações ansiolíticas no teste de labirinto em ratos (MARTINS *et al.*, 2005).

2.2.4.3 GRP e autismo

Estudos genéticos em humanos têm sugerido uma possível associação entre o gene dos GRPR e o TEA. Uma translocação X;8 no primeiro íntron do gene do GRPR tem sido identificado em pacientes com autismo acompanhado de retardo mental e epilepsia, indicando que o gene do GRPR é um dos genes candidatos no autismo e que mudanças no funcionamento cerebral desses receptores durante o desenvolvimento podem estar associadas às alterações comportamentais encontradas nas desordens do neurodesenvolvimento (ISHKAWA-BRUSH *et al.*, 1997). Mais recentemente, foi descrito mutações C6S e L181F no gene do GRPR em dois pacientes com o transtorno (SEIDITA *et al.*, 2008).

Em 2007, com o objetivo de determinar o possível efeito do GRPR no desenvolvimento neurológico e no TEA, Presti-Torres e colaboradores promoveram o bloqueio farmacológico do GRPR em ratos durante o período neonatal através da administração sistêmica de RC-3095 nos primeiros 10 dias após o nascimento. Os ratos demonstraram pronunciados e permanentes déficits de interação social quando testados com 30-35 e após com 60 dias de vida, tanto na frequência de contato quanto no tempo de interação social (PRESTI-TORRES *et al.*, 2007) (Figura 3). Os déficits na interação social causados pelo bloqueio neonatal do GRPR foram revertidos com a administração sistêmica do antipsicótico atípico clozapina (PRESTI-TORRES *et al.*, 2012). Outro estudo com o bloqueio farmacológico do GRPR de ratos no período neonatal demonstrou redução da preferência ao odor materno em testes realizados para avaliar o comportamento de apego em ratos recém-nascidos (GARCIA *et al.*, 2010). Juntos, esses achados sugerem que o bloqueio GRPR durante o desenvolvimento do SNC

pode levar a alterações comportamentais compatíveis com TEA, e suportam a possibilidade de que uma expressão ou um funcionamento anormal do GRPR possa ter um papel na patogênese dessa doença (PRESTI-TORRES *et al.*, 2007, 2012; ROESLER e SCHWARTSMANN, 2012).

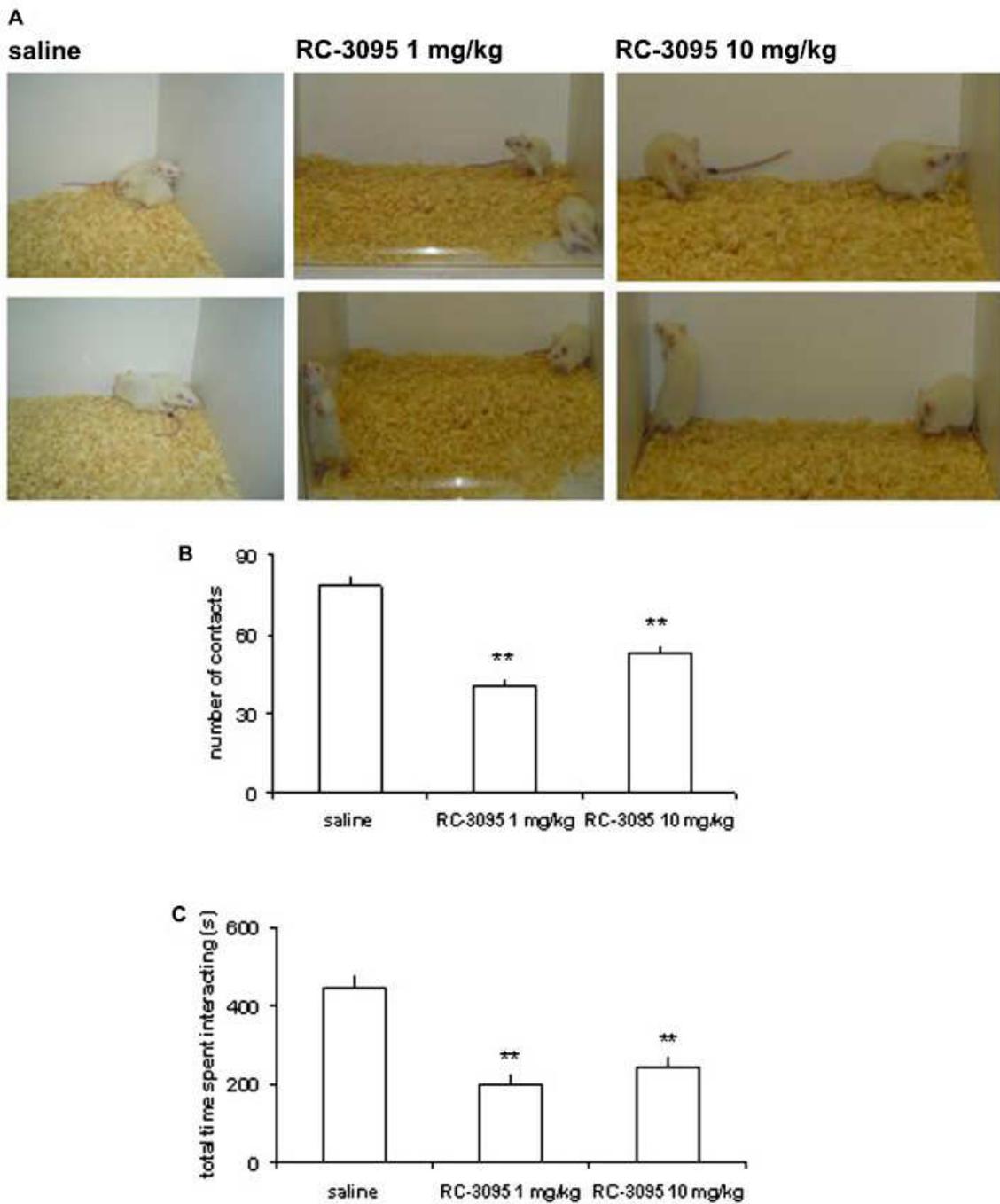


Figura 3 - Alterações comportamentais permanentes em ratos obtidas pelo bloqueio do GRPR no período de desenvolvimento do SNC

Fonte: ROESLER e SCHWARTSMANN, 2012.

2.2.4.4 Estudos clínicos com GRP

Há dois estudos clínicos com GRP. Em 1994, Gutzwiller e colaboradores realizaram um ensaio randomizado, duplo-cego, com 20 homens voluntários saudáveis para avaliar possível efeito do GRP endovenoso, em três dosagens (10, 40 e 160 picomol/kg/h), sobre a ingestão alimentar. Encontraram uma redução significativa na ingestão de calorias e uma redução de 19% na ingestão de alimentos, embora essa não tenha sido estatisticamente significativa. Esse estudo suporta a ideia de que o GRP e outros peptídeos da família bombesina possam atuar como sinalizadores endógenos no controle da ingestão alimentar de humanos. Não foram descritos quaisquer efeitos adversos nesse estudo (GUTZWILLER *et al.*, 1994).

O segundo estudo clínico foi realizado em 2001 por Clive e colaboradores. Nesse estudo, foi administrado GRP endovenoso, em doses de 3 a 450 pmol/min, a sete homens saudáveis voluntários para estudar possíveis efeitos vasculares desse peptídeo. Demonstraram que o GRP atua localmente na resistência vascular dos vasos, podendo ter um potente efeito vasodilatador arteriolar dose-dependente, com início de ação muito rápido e com duração de efeito de aproximadamente 20 minutos (CLIVE *et al.*, 2001). Nenhum paciente do estudo teve efeitos adversos ou hipotensão arterial.

3 ESTUDO PILOTO

Realizou-se um estudo piloto com três pacientes com autismo infantil clássico com o objetivo de avaliar a metodologia que seria aplicada na pesquisa, a segurança e a tolerabilidade da infusão de GRP na dose de 160 pmol/kg e seus possíveis efeitos terapêuticos nos sintomas do espectro autista. Nesse estudo também foi pesquisado a duração do efeito do GRP e se a repetição das infusões traria alguma alteração nos resultados obtidos (Artigo 1).

4 JUSTIFICATIVA

O TEA é um distúrbio crônico, na maioria das vezes com graves prejuízos no funcionamento cognitivo, emocional e comportamental. A maioria dos pacientes apresenta déficit cognitivo moderado ou grave, e não adquirem capacidade de viver de forma independente (MYERS e JOHNSON, 2007). É um transtorno prevalente, afetando aproximadamente 1% das crianças e não se afasta a possibilidade de uma epidemia do transtorno, já que sua prevalência vem aumentando significativamente nos últimos anos (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2009). Apensar do imenso número de pesquisas no assunto nas últimas décadas, ainda se desconhece sua etiologia.

Até o momento, não há nenhum tratamento capaz de reverter completamente os sintomas do autismo e o tratamento medicamentoso diminui apenas sintomas mal-adaptativos e comportamentais que possam interferir no funcionamento e na saúde física do paciente (BENVENUTO *et al.*, 2013).

A gravidade da doença, a sua prevalência e a ausência de tratamento efetivo faz com que a busca pela compreensão da etiologia exata do TEA e por novos tratamentos sejam urgentes e de extrema importância.

Estudos têm demonstrado que o GRP modula uma série de comportamentos e estudos de modelo animal sugerem que o bloqueio de sua ação durante o desenvolvimento do SNC pode levar a alterações comportamentais compatíveis com TEA, suportando a possibilidade de que uma expressão ou um funcionamento anormal do GRPR durante o desenvolvimento possa ter um papel na sua patogênese (PRESTI-TORRES *et al.*, 2007, 2012; ROESLER e SCHWARTSMANN, 2012).

Com o estudo piloto, teve-se a oportunidade de testar o GRP em crianças autistas pela primeira vez, e esse se mostrou seguro e sem efeitos adversos. Embora seja um estudo inicial, de caráter exploratório e sem rigor metodológico, a três crianças parecem ter apresentado

melhora em alguns sintomas do espectro, embora os instrumentos utilizados para a avaliação tenham sido pouco sensíveis em detectá-las.

Esses achados iniciais sugerem que o tratamento sistêmico com GRP seja seguro, tenha boa tolerância e possa ser promissor no TEA, sendo necessário estender o estudo, com o aumento no número de casos e a utilização de outros instrumentos de avaliação, mais sensíveis na detecção de mudanças sutis de comportamento.

5 OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste estudo é avaliar o efeito do GRP na dose de 160 pmol/kg nos sintomas do espectro autista (interação social, comunicação e comportamentos restritos e estereotipados) em dez pacientes pediátricos com diagnóstico de autismo clássico.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar a segurança e a tolerabilidade da administração parenteral de curto prazo de GRP;
- b) Avaliar a ocorrência de efeitos adversos durante e após a administração de GRP;
- c) Avaliar a duração do possível efeito terapêutico;

6 METODOLOGIA

6.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Ensaio clínico aberto, não controlado, de fase II.

6.2 AMOSTRA

A amostra foi obtida por conveniência. A pesquisa foi divulgada no ambulatório de TID do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) por meio de cartazes e em meio de comunicação (jornal de grande circulação). Os voluntários receberam um termo de esclarecimento para voluntários (APÊNDICE C -) e uma ficha que deveria ser preenchida pelo médico assistente e entregue aos pesquisadores caso houvesse interesse em participar da pesquisa (APÊNDICE D -). Se houvessem mais de dez voluntários, esses seriam selecionados pela ordem de entrega da ficha de interesse de participação.

6.2.1 Critérios de Inclusão

- a) Diagnóstico de autismo pelos critérios do DSM-IV-TR, confirmados pelo julgamento do pesquisador;
- b) Idade entre 3 e 18 anos;
- c) Neuroimagem normal (tomografia computadorizada ou ressonância magnética de crânio);
- d) Investigação genética normal (cariótipo para meninas; cariótipo e pesquisa de X-Frágil para meninos);

6.2.2 Critérios de Exclusão

- a) Ser portador de condições associadas ao aumento da secreção ácida no sistema gastrointestinal (gastrite, úlcera gástrica, úlcera duodenal, esofagite de refluxo), diabetes mellitus ou cardiopatia;
- b) Presença de autismo secundário (doenças genéticas, malformações cerebrais, déficits sensoriais, etc...);
- c) Residir fora do município de Porto Alegre ou da região metropolitana;
- d) Ter seu tratamento (medicamentoso ou outras formas de intervenção) modificado no período de 4 semanas antes da inclusão no estudo;
- e) Pais se negarem a assinar o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (APÊNDICE E -) ou não se comprometerem a não alterar outros tratamentos que o paciente possa estar em uso no período da pesquisa (medicamentoso ou outras formas de intervenção);

6.3 INTERVENÇÃO

Os pacientes foram submetidos a infusões endovenosas de GRP na dose de 160 picomol/kg, uma vez ao dia, por 4 dias consecutivos.

O GRP humano utilizado no estudo foi sintetizado pela empresa Biopeptide Co. Inc., de San Diego, CA, EUA e está disponível no mercado internacional, sendo adquirido pela equipe de pesquisa (lote número 0912085780; 13/09/2008; 2g; 95% > puro por HPLC). Apresenta níveis de pureza adequados para ensaios clínicos.

6.4 VARIÁVEIS EM ESTUDO

Nesse estudo foram avaliadas as seguintes variáveis:

- a) valor da escala *Clinical Global Impression-Improvement Scale* (CGI-I);

- b) valores das subescalas da *Aberrant Behavior Checklist* (ABC): I-irritabilidade, agitação e choro; II-letargia e esquivas sociais; III-comportamento estereotipado; IV-hiperatividade; V-fala inapropriada;
- c) valor da escala *Childhood Autism Rating Scale* (CARS);
- d) valores dos domínios da *Autism Diagnostic Interview-Revised* (ADI-R): A- Anormalidades Qualitativas na Interação Social Recíproca; B- Anormalidades Qualitativas na Comunicação; C-Padrões Repetitivos e Estereotipados de Comportamento;
- e) duração do possível efeito terapêutico;
- f) tolerância às infusões de GRP;
- g) possíveis efeitos adversos;

6.5 DESFECHO ESPERADO

Espera-se como desfecho da intervenção uma diminuição dos escores dos instrumentos utilizados na avaliação dos sintomas do TEA.

6.6 FERRAMENTAS DE PESQUISA

6.6.1 Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Edition, Text Revised (DSM-IV-TR)

Manual publicado no ano de 2000 pela *American Psychiatric Association* para diagnóstico dos transtornos mentais. Foi utilizado o capítulo XX, com os critérios diagnósticos para o TEA (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2002);

6.6.2 Autism Diagnostic Interview-Revised (ADI-R)

Entrevista semiestruturada aplicada aos pais e/ou responsáveis da criança com suspeita de autismo. É considerada, atualmente, um dos métodos padrão-ouro para diagnóstico de autismo, de fundamental importância em pesquisas e publicações. Já foi traduzida e validada em vários países. Além de ser diagnóstica, permite que se quantifique a sintomatologia atual e se avalie a eficácia de uma intervenção. Não classifica o transtorno em formas leves, moderadas ou severas. Trabalha com escores de pontuação nas três grandes áreas de sintomatologia do autismo (déficit de interação social, déficit de comunicação, comportamento repetitivo e interesses restritos). Aplica-se a indivíduos com idade mental mínima de 2 anos. É constituída de 93 itens, dos quais 42 são avaliados e sistematicamente combinados para produzir o resultado final e interpretável do instrumento (BECKER *et al.*, 2010; LORD *et al.*, 1994).

6.6.3 Childhood Autism Rating Scale (CARS)

Instrumento que auxilia no diagnóstico de crianças com autismo e as distingue de crianças com prejuízo no desenvolvimento, sem TEA. É especialmente eficaz na distinção de casos de autismo leve, moderado e grave, além de fornecer escores objetivos e quantificáveis. Pode ser usada para crianças acima de 2 anos de idade. É uma entrevista aplicada aos pais e/ou responsáveis, formada por 15 itens, que avaliam 14 domínios do comportamento, geralmente afetados em autistas. Os escores de cada domínio variam de 1 (dentro dos limites da normalidade) a 4 (sintomas autistas graves). A pontuação varia de 15 a 60, sendo o ponto de corte para autismo 30 (PEREIRA *et al.*, 2008; SCHOPLER *et al.*, 1988).

6.6.4 Aberrant Behavior Checklist (ABC)

Escala desenvolvida para avaliar efeito de intervenções terapêuticas (medicamentosa ou não) em indivíduos com prejuízo cognitivo. Não é específica para o TEA, mas é uma das escalas mais conhecidas e usadas em estudos psicofarmacológicos. É composta por 58 itens, divididos em 5 subescalas (I-irritabilidade, agitação e choro; II-letargia e esquivas sociais; III-comportamento estereotipado; IV-hiperatividade; V- fala inapropriada). Para cada item há as seguintes opções de pontuação: 0- não é problema; 1- o comportamento é um problema, mas em grau leve; 2- o problema tem gravidade moderada; 3- o problema é grave (AMAN *et al.*, 1985; LOSAPIO *et al.*, 2011).

6.6.5 Clinical Global Impression (CGI)

Instrumento simples, de fácil aplicação, respondida pelo pesquisador, universalmente reconhecida e utilizada em estudos terapêuticos com pacientes com distúrbios mentais. Apresenta dois componentes, sendo que o primeiro (CGI-S: *Clinical Global Impression – Severity scale*) avalia a severidade da doença, com escores variando de 1 (normal, não doente) a 7 (doença mental extremamente grave), e o segundo (CGI-I: *Clinical Global Impression – Improvement scale*) a melhora global desde o início do tratamento, com escores variando de 1 (muito melhor) a 7 (muito pior) (GUY, 1976).

Além desses instrumentos, após as infusões os pais ou responsáveis preencheram semanalmente um tabela sobre a evolução dos sintomas mais importantes do transtorno do espectro autista, a fim de se determinar a duração dos possíveis efeitos terapêuticos. Nela há os principais sintomas do espectro autista, com as seguintes opções: bem melhor, melhor, igual, pior ou bem pior (APÊNDICE F -). As tabelas foram preenchidas durante o seguimento de 4 semanas.

6.7 LOCAL DE REALIZAÇÃO

As infusões de GRP foram realizadas em leitos da sala de infusões do Centro de Pesquisas Clínicas (CPC) do HCPA. As entrevistas e os encontros com os pais e ou responsáveis foram realizadas no ambulatório de TID do HCPA. A escala ADI-R foi aplicada no Instituto de Psicologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

6.8 LOGÍSTICA

Duas semanas antes do início das infusões de GRP os pais e/ou responsáveis assinavam o TCLE e os pacientes começavam o uso oral de omeprazol 40 mg ao dia. O uso desta medicação objetivou reduzir o efeito do GRP na liberação de gastrina e o risco de efeitos adversos secundários ao aumento da secreção de ácidos no TGI. Esse era mantido por 5 semanas. Na literatura, não há citação de que o uso de omeprazol possa interferir nos sintomas do TEA.

A família era contatada por telefone por psicólogas que participaram do estudo para agendar a entrevista ADI-R. Essa era realizada na semana anterior às infusões de GRP.

No dia anterior às infusões os pais e/ou responsáveis respondiam as escalas CARS, ABC e CGI aplicadas por um dos pesquisadores.

O paciente era então submetido à administração do GRP na dose de 160 pmol/kg por via endovenosa, diariamente, por 4 dias consecutivos. As infusões eram realizadas no CPC do HCPA, em 30 minutos, ficando o paciente em observação quanto ao surgimento de possíveis efeitos colaterais por 1 hora após o seu término. Durante este período, o paciente era acompanhado por um dos médicos pesquisadores com monitorização dos sinais vitais e de possíveis efeitos colaterais. Após o paciente e sua família eram liberados e estimulados a seguirem sua rotina diária habitual.

No último dia de infusões eram aplicadas as escalas CGI-I e CARS. As escalas ABC e ADI-R eram aplicadas na semana seguinte às infusões.

Não foi realizado um segundo ciclo de infusão por esse não ter mostrado benefício em comparação ao ciclo único no estudo piloto.

Após as infusões de GRP, os pais e/ou responsáveis encontraram-se semanalmente com um dos pesquisadores por quatro semanas, para reavaliação dos sintomas do espectro autista e de possíveis efeitos indesejáveis. Nos segundo, terceiro e quarto encontros não eram aplicadas escalas.

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

7 ASPECTOS ESTATÍSTICOS

7.1 CÁLCULO DO TAMANHO DA AMOSTRA

Com base nos resultados do estudo piloto (escore da CARS), onde foi encontrado desvio padrão pré-infusão de 2,1 e pós-infusão de 3,3, com diferença média de escore de 2,8, esperando-se encontrar uma diferença de 3 pontos nos escores pré e pós infusão, com nível de significância de 5%, poder de 80% e correlação de 0,5, foi estimado um n mínimo de 10 pacientes, totalizando 20 observações.

7.2 ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os dados foram armazenados em banco de dados criado em planilha Excel e após transportados para o programa SPSS (Statistical Package for the Social Sciences), versão 18.0, onde foram processados e analisados.

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

Na comparação dos escores das escalas e subescalas, pré e pós-infusão de GRP, foi utilizado o teste t de *Student* para amostras emparelhadas. Para significância estatística, foi considerado um valor de p igual ou menor a 0,05.

Na análise dos dados, foi considerada resposta positiva ao tratamento uma diminuição igual ou maior que 25% entre os escores pré e pós-infusão em pelo menos uma das subescalas da ABC e resposta “melhor” ou “muito melhor” na subescala de melhora global da CGI-I.

Para o cálculo do tamanho do efeito, foi utilizado a fórmula *d* de *Cohen*.

8 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA (registro no Grupo de Pesquisas do HCPA 12-0219). Os pais e/ou responsáveis assinaram o TCLE (APÊNDICE E -), já que os pacientes incluídos no estudo apresentam limitações cognitivas e são menores de idade.

O estudo seguiu todos os aspectos éticos e metodológicos da Resolução 466/12 - Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos, e Resolução 251/97 - Normas de Pesquisa com Novos Fármacos, Medicamentos, Vacinas e Testes Diagnósticos Envolvendo Seres Humanos.

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

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

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

A sua futura submissão aos órgãos regulatórios dependerá da confirmação do potencial terapêutico da intervenção, com base nas observações derivadas desta série limitada de casos e de estudos futuros randomizados, duplo-cegos e controlados por placebo, bem como dos resultados dos estudos toxicológicos.

9 REFERÊNCIAS

- 1 Aman MG, Singh NN, Stewart AW, Field CJ. The Aberrant Behavior Checklist: a behavior rating scale for the assessment of treatment effects. *Am J Ment Defic.* 1985;89:485-91.
- 2 Amaral DG. The promise and the pitfalls of autism research: An introductory note for new autism researchers. *Brain Research.* 2011;1380:3-9.
- 3 American Psychiatric Association. Autism Spectrum Disorder. In: American Psychiatric Association. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition-DSM-V.* 5th ed. Washington: DC: American Psychiatric Publishing; 2013. p. 50-9.
- 4 American Psychiatric Association. Transtornos Globais do Desenvolvimento. In: American Psychiatric Association. *Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais, Quarta Edição, Texto revisado -DSM-IV-TR.* 4. ed. Porto Alegre: Artmed; 2002. p.98-111.
- 5 Anagnostou E, Shevell M. Evolução de Crianças com Autismo. In: Rapin I, Tuchman R. *Autismo- abordagem neurobiológica.* São Paulo: Artmed; 2009. p.328-43.
- 6 Assumpção Jr. FB, Kuczynski E, Gabriel MR, Rocca CC. Escala de Avaliação de Traços Autísticos (ATA): Validade e Confiabilidade de uma Escala para a Detecção de Condutas Autísticas. *Arq Neuro Psiquiatr.* 1999;57:23-9.
- 7 Assumpção Jr. FB, Pimentel AC. Autismo Infantil. *Rev Bras Psiquiatr.* 2000;22:37-9.
- 8 Aylward EH, Minshew NJ, Field K, Sparks BF, Singh N. Effects of age on brain volume and head circumference in autism. *Neurology.* 2002;59:175-183.
- 9 Baird G, *et al.*. Screening and surveillance for autism and pervasive developmental disorders. *Arch Dis Child.* 2001;84:468-75.
- 10 Bauman M, Kemper TL. Histoanatomic observations of the brain in early infantile autism. *Neurology.* 1985;35:866-74.
- 11 Becker MM, Wagner MB, Bosa CA, Schmidt C, Longo D, Papaleo C, Riesgo RS. Translation and validation of Autism Diagnostic Interview-Revised (ADI-R) for autism diagnosis in Brazil. *Arq Neuropsiquiatr.* 2012;70:185-90.
- 12 Belger A, Carpenter KLH, Yucel GH, Cleary KM, Donkers FCL, The Neural Circuitry of Autism. *Neurotox Res.* 2011;20:201-14.
- 13 Benvenuto A, Battan B, Porfirio MC, Curatolo P. Pharmacotherapy of autism spectrum disorders. *Brain Dev.* 2013;35:119-27.
- 14 Bertrand J, Mars A, Boyle C, Bove F, Yeargin-Allsopp M, Decoufle P. Prevalence of autism in a United States population: the Brick Township, New Jersey, investigation. *Pediatrics.* 2001;108:1155-61.

- 15 Betancur C. Etiological heterogeneity in autism spectrum disorders: More than 100 genetic and genomic disorders and still counting. *Brain Research*. 2010;1380:42-77.
- 16 Bissette G, Nemeroff CB, Decker MW, Kizer JS, Agid Y, Javoy-Agid E. Alterations in regional brain concentrations of neurotensin and bombesin in Parkinson's disease. *Ann Neurol*. 1985;17:324-8.
- 17 Bölte S, Marschik PB, Falck-Ytter T, Charman T, Roeyers H, Elsabbagh M. Infants at risk for autism: a European perspective on current status, challenges and opportunities. *Eur Child Adolesc Psychiatry*. 2013;22:341-8.
- 18 Bosa C, Callias M. Autismo: breve revisão de diferentes abordagens. *Psicol Reflex Crit*. 2000;13:167-77.
- 19 Brambilla P, Hardan AY, di Nemi SU, Caverzasi E, Soares JC, Perez J, *et al.*. The functional neuroanatomy of autism. *Funct Neurol*. 2004;19:9-17.
- 20 Bransjevic I, Steinbusch HWM, Schmitz C, Martinez PM. Delivery of peptide and protein drugs over the blood-brain barrier. *Progress in Neurobiol*. 2009;87:212-51.
- 21 Brown M, Rivier J, Vale W. Bombesin affects the central nervous system to produce hyperglycemia in rats. *Life Sci*. 1977b;21:1729-34.
- 22 Brown M, Rivier J, Vale W. Bombesin: potent effects on thermoregulation in the rat. *Science*. 1977a;196:998-1000.
- 23 Buie T, Campbell DB, Fuchs GJ III, *et al.*. Evaluation, diagnosis, and treatment of gastrointestinal disorders in individuals with ASDs: a consensus report. *Pediatrics*. 2010;125:S1-S18.
- 24 Capsoni S, Giannotta S, Cattaneo A. Nerve growth factor and galantamine ameliorate early signs of neurodegeneration in anti-nerve growth factor mice. *Proc Natl Acad Sci (USA)*. 2002;99:12432-43.
- 25 Carroll RE, Ostrouskly D, Lee S, Danilkovich A, Benya RV. Characterization of gastrin-releasing peptide and its receptor aberrantly expressed by human colon cancer cell lines. *Mol Pharmacol*. 2000;58:601-7.
- 26 Centers for Disease Control and Prevention. Prevalence of autism spectrum disorders – Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, six sites, United States, 2000. *MMWR Surveill Summ*. 2007;56:1-11.
- 27 Centers for Disease Control and Prevention. Prevalence of autism spectrum disorders – Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, United States, 2006. *MMWR Surveill Summ*. 2009;58:1-20.
- 28 Centers for Disease Control and Prevention. Prevalence of autism spectrum disorders – Autism and developmental disabilities monitoring network, 14 sites, United States, 2008. *MMWR Surveill Summ*. 2012;61:1-19.
- 29 Charmam T, Baird G. Practitioner review: Diagnosis of autism spectrum disorder in 2-3-year-old children. *J Child Psychol Psychiatry*. 2002;43:289-305.

- 30 Charmam T, Howlin P, Berry B, Prince E. Measuring developmental progress of children with autism spectrum disorder on school entry using parent report. *Autism*. 2004;8(1):89-100.
- 31 Chawarska K, Paul R, Klin A, Hannigen S, Dichtel LE, Volkmar F. Parental recognition of developmental problems in toddlers with autism spectrum disorders. *J Autism Dev Disord*. 2007;37:62-72.
- 32 Chugani D. Neuroimaging and Neurochemistry of Autism. *Pediatr Clin N Am*. 2012;59:63-73.
- 33 Clive S, Jodrell D, Webb D. Gastrin-releasing peptide is a potent vasodilator in humans. *Clin Pharmacol Ther*. 2001; 69:252-9.
- 34 Cook EH, Scherer SW. Copy-number variations associated with neuropsychiatric conditions. *Nature*. 2008;455:919-923.
- 35 Cornelio D, Roesler R, Schwartzmann G. Gastrin-releasing peptide as a molecular target in experimental anticancer therapy. *Ann Oncol*. 2007;18:1457-66.
- 36 Dadds MR, MacDonald E, Cauchi A, Williams K, Levy F, Brennan J. Nasal Oxytocin for Social Deficits in Childhood Autism: A Randomized Controlled Trial. *J Autism Dev Disord*. 2013 Jul 26. [Epub ahead of print]
- 37 Dal Pizzol F, Di Leone LP, Ritter C, Martins MR, Reinke A, Pens Gelain D, *et al.*. Gastrin-releasing peptide receptor antagonist effects on an animal model of sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;173:84-90.
- 38 Dapretto M, Davies MS, Pfeifer JH, Scott AA, Sigman M, Bookheimer SY, *et al.*. Understanding emotions in others: mirror neuron dysfunction in children with autism spectrum disorders. *Nat Neurosci*. 2006;9:28-30.
- 39 De Giacomo A, Fombonne E. Parental recognition of developmental abnormalities in autism. *Eur Child Adolesc Psychiatry*. 1998;7:131-6.
- 40 De la Paz MP, Arroyo MJF, Touriño E, Boada L. Investigación epidemiológica em el autismo: una visión integradora. *Rev Neurol*. 2005;40:S191-8.
- 41 Degim T, Celebi N. Controlled delivery of peptides and proteins. *Curr Pharm Design*. 2007;13:99-117.
- 42 Duchan E, Patel DR. Epidemiology of Autism Spectrum Disorders. *Pediatr Clin N Am*. 2012;59:27-43.
- 43 Erspamer V, Erspamer GF, Inselvini M. Some pharmacological actions of alytesin and bombesin. *J Pharm Pharmacol*. 1970;22:875-6.
- 44 Fekete E, Vigh J, Bagi EE, Lénárd L. Gastrin-releasing peptide microinjected into the amygdala inhibits feeding. *Brain Res*. 2002;955:55-63
- 45 Fernell E, Eriksson MA, Gilberg C. Early diagnosis of autism and impact on prognosis: a narrative review. *Clinical Epidemiology*. 2013;5:33-43.

- 46 Fernell E, Hedvall A, Westerlund J, *et al.*. Early intervention in 208 Swedish preschoolers with autism spectrum disorder: a prospective naturalistic study. *Res Dev Disabil.* 2011;32:2092-2101.
- 47 Frazier TW, Youngstrom EA, Speer L, Embacher R, Law P, Constantino J, *et al.*. Validation of proposed DSM-5 criteria for autism spectrum disorder. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.* 2012;51:28-40.
- 48 Gadia CA, Tuchman R, Rotta NT. Autismo e doenças invasivas de desenvolvimento. *J Pediatr (Rio J).* 2004;80:83-94.
- 49 Ganz JB, Davis JL, Lund EM, Goodwyn FD, Simpson RL. Meta-analysis of PECS with individuals with ASD: investigation of targeted versus non-targeted outcomes, participant characteristics, and implementation phase. *Res Dev Disabil.* 2012;33:406-18.
- 50 Ganz ML. The lifetime distribution of the incremental societal costs of autism. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 2007;161:343-349.
- 51 Garcia VA, Dornelles AS, Presti-Torres J, Alcalde LA, Halmenschlager LH, Schwartzmann G, *et al.*. Neonatal gastrin-releasing peptide receptor blockade reduces maternal odor preference in rats. *Behav Brain Res.* 2010;214:456-9.
- 52 Gerner RH, Van Kammen DP, Ninan PT. Cerebrospinal fluid cholecystokinin, bombesin and somatostatin in schizophrenia and normals. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 1985;9:73-82.
- 53 Gibbs J, Kulkosky PJ, Smith GP. Effects of peripheral and central bombesin on feeding behavior of rats. *Peptides.* 1981;2:179-83.
- 54 Gibson GE, Vestling M, Zhang H, Szolosi S, Alkon D, Lannfelt L, *et al.*. Abnormalities in Alzheimer's disease fibroblasts bearing the APP670/671 mutation. *Neurobiol Aging.* 1997;18:573-80.
- 55 Gillberg C. Infantile autism: diagnosis and treatment. *Acta Psychiatr Scand.* 1990;81:209-15.
- 56 Gonzales N, Moody TW, Igarashi H, Tetsuhide I, Jensen RT. Bombesin-Related peptides and their receptors: recent advances in their role in physiology and disease states. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2008;15:58-64.
- 57 Green LA, Fein D, Modahl C, Feinstein C, Waterhouse L, Morris M. Oxytocin and autistic disorder: Alterations in peptide forms. *Biol Psychiatry.* 2001;50:609-13.
- 58 Gregory S, Connelly J, Towers A, Johnson J, Biscocho D, Markunas C, *et al.*. Genomic and epigenetic evidence for oxytocin receptor deficiency in autism. *BMC Medicine.* 2009;7:62.
- 59 Guastella AJ, Einfeld SL, Gray KM, Rinehart NJ, Tonge BJ, Lambert TJ, *et al.*. Intranasal oxytocin improves emotion recognition for youth with autism spectrum disorders. *Biol Psychiatry.* 2010;67:692-4.

- 60 Guastella AJ, Mitchell PB, Dadds MR. Oxytocin increases gaze to the eye region of human faces. *Biological Psychiatry*. 2008;63:3-5.
- 61 Gutzwiller JP, Drewe J, Hildebrand P, Rossi L, Zwimpfer L, Beglinger C. Effect of Intravenous Human Gastrin-Releasing Peptide on Food Intake in Humans. *Gastroenterology*. 1994;106:1168-73.
- 62 Guy W. ECDEU assessment manual for psychopharmacology US Department of Health, Education, and Welfare publication (ADM) 76-338. Rockville, MD: National Institute of Mental Health. 1976;218-22.
- 63 Hagerman R, Au J, Hagerman P. FMR1 premutation and full mutation molecular mechanisms related to autism. *J Neurodev Disord*. 2011;3:211-24.
- 64 Hodge SM, Makris N, Kennedy DN, Caviness VS Jr, Howard J, McGrath L, *et al.*. Cerebellum, language, and cognition in autism and specific language impairment. *J Autism Dev Disord*. 2010;40:300-316.
- 65 Hollander E, Bartz J, Chaplin W, Phillips A, Sumner J, Soorya L, *et al.*. Oxytocin increases retention of social cognition in autism. *Biol Psychiatry*. 2007;61:498-503.
- 66 Hollander E, Novotny S, Hanratty M, Yaffe R, DeCaria CM, Aronowitz BR, *et al.*. Oxytocin infusion reduces repetitive behaviors in adults with autistic and Asperger's disorders. *Neuropsychopharmacology*. 2003;28:193-8.
- 67 Hollander E, Soorya L, Wasserman S, Esposito K, Chaplin W, Anagnostou E. Divalproex sodium vs placebo in the treatment of repetitive behaviors in autism spectrum disorders. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2006;9:209-13.
- 68 Horvath K, Stefanatos G, Sokolski KN, Wachtel R, Nabors L, Tildon JT. Improved social and language skills after secretin administration in patients with autistic spectrum disorders. *J Assoc Acad Minor Phys*. 1998;9:9-15.
- 69 Howlin P, Goode S, Hutton J, Rutter M. Adult outcome for children with autism. *J Child Psychol Psychiatry*. 2004;45:212-29.
- 70 Howlin P, Goode S, Hutton J, Rutter M. Savant skills in autism: Psychometric approaches and parental reports. In: Happé F, Frith U. *Autism and talent*. Oxford: University Press; 2010. p.13-24.
- 71 Howlin P, Mawhood L, Rutter M. Autism and developmental receptive language disorder- a follow up comparison in early adult life. II: Social, behavioral, and psychiatric outcomes. *J Child Psychol Psychiatry*. 2000; 41:561-78.
- 72 Ishikawa-Brush Y, Powell JF, Bolton P, Miller AP, Francis F, Willard HF, *et al.*. Autism and multiple exostoses associated with an X;8 translocation occurring within the GRPR gene and 3' to the SDC2 gene. *Hum Mol Genet*. 1997;6:1241-50.
- 73 Kamichi S, Wada E, Aoki S, Sekiguchi M, Kimura I, Wada K. Immunohistochemical localization of gastrin-releasing peptide receptor in the mouse brain. *Brain Res*. 2005;1032:162-70.

- 74 Kanner L. Autistic Disturbances of Affective Contact. *The Nervous Child*. 1942;2:217-51.
- 75 Kanner L. Early infantile autism: diagnosis, current research and management. New York: Spectrum; 1956.
- 76 Kaplan G, McCracken JT. Psychopharmacology of Autism Spectrum Disorders. *Pediatr Clin N Am*. 2012;59:175-87.
- 77 Kauer-Sant'Anna M, Andrezza AC, Valvassori SS, Martins MR, Barbosa LM, Schwartzmann G, *et al.*. A gastrin-releasing peptide receptor antagonist blocks D-amphetamine-induced hyperlocomotion and increases hippocampal NGF and BDNF levels in rats. *Peptides*. 2007;28:1447-52.
- 78 Kim J, Wigram T, Gold C. The effects of improvisational music therapy on joint attention behaviors in autistic children: a randomized controlled study. *J Autism Dev Disord*. 2008;38:1758-66.
- 79 Kleinmann JM, Ventola PE, Pandey J, Verbalis AD, Barton M, Hodgson S, *et al.*. Diagnostic Stability in Very Young Children with Autism Spectrum Disorders. *J Autism Dev Disord*. 2008;38:606-15.
- 80 Klin A. Autismo e síndrome de Asperger: uma visão geral. *Rev Bras Psiquiatr*. 2006;28:S3-11.
- 81 Kopp S, Kelly KB, Gillberg C. Girls with social and/or attention deficits: a descriptive study of 100 clinic attenders. *J Atten Disord*. 2010;14:167-81.
- 82 Kosaka H, Omori M, Munesue T, Ishitobi M, Matsumura Y, Takahashi T, *et al.*. Smaller insula and inferior frontal volumes in young adults with pervasive developmental disorders. *Neuroimage*. 2010;50:1357-63.
- 83 Kosfeld M, Heinrichs M, Zaks PJ, Fischbacher U, Fehr E. Oxytocin increases trust in humans. *Nature*. 2005;435:673-76.
- 84 Krishnaswami S, McPheeters ML, Veenstra-VanderWeele J. A Systematic Review of Secretin for Children With Autism Spectrum Disorder. *Pediatrics*. 2011;127(5):e1322-5.
- 85 Lam KSL, Aman MG, Arnold LE. Neurochemical correlates of autistic disorder: A review of the literature. *Res Dev Disabil*. 2006;27:254-89.
- 86 LeBlanc LA, Gillis JM. Behavioral Interventions for Children with Autism Spectrum Disorders. *Pediatr Clin N Am*. 2012;59:147-64.
- 87 Levy SE, Mandell DS, Schultz RT. Autism. *Lancet*. 2009;374:1627-38.
- 88 Lord C, Rutter M, Goode S, Heemsbergen J, Jordan H, Mawhood L, Schopler E. Autism diagnostic observation schedule: a standardized observation of communicative and social behavior. *J Autism Dev Disord*. 1989;19:185-212.

- 89 Lord C, Rutter M, Le Couteur A. Autism Diagnostic Interview-Revised: A Revised Version of a Diagnostic Interview for Caregivers of Individuals with Possible Pervasive Developmental Disorders. *J Autism and Dev Disord*. 1994;24:659-85.
- 90 Losapio MF, Silva LG, Pondé MP, Novaes CM, dos Santos DN, Argollo N, *et al.*. Partial cross-cultural adaptation of the Aberrant Behavior Checklist (ABC) scale for analysis of patients with mental retardation. *Cad Saude Publica*. 2011;27:909-23.
- 91 Luft T, Amaral OB, Schwartzmann G, Roesler R. Transient disruption of fear-related memory by gastrin-releasing peptide or N-methyl-D-aspartate receptors in the hippocampus. *Curr Neurovasc Res*. 2008;5:21-7.
- 92 Malatova L, Cabral FR. Peptides: Important tools for the treatment of central nervous system disorders. *Neuropeptides*. 2011;45:309-16.
- 93 Malow B, Adkins KW, McGrew SG, Wang L, Goldman SE, Fawkes D, *et al.*. Melatonin for sleep in children with autism: a controlled trial examining dose, tolerability, and outcomes. *J Autism Dev Disord*. 2012;42:1729-37.
- 94 Marcus RN, Owen R, Kamen L, Manos G, McQuade RD, Carson WH, *et al.*. A placebo-controlled, fixed-dose study of aripiprazole in children and adolescent with irritability associated with autistic disorder. *J Am Acad Child Adolescent Psychiatry*. 2009;48:1110-9.
- 95 Martins MR, Reinke A, Valvassori SS, Machado RA, Quevedo J, Schwartzmann G, *et al.*. Non-associative learning and anxiety in rats treated with a single systemic administration of the gastrin-releasing peptide receptor antagonist RC-3095. *Peptides*. 2005;26:2525–29.
- 96 Matsuzaki M, Matsushita H, Tomizawa K, Matsui H. Oxytocin: a therapeutic target for mental disorders. *J Physiol Sci*. 2012;62:441-4.
- 97 McGonigle P. Peptide therapeutics for CNS indications. *Biochem Pharmacol*. 2012;83:559-66.
- 98 McPheeters ML, Warren Z, Sathe N, Bruzek JL, Krishnaswami S, Jerome RN, *et al.*. A Systematic review of medical treatments for children with autism spectrum disorders. *Pediatrics*. 2011;127:e1312-21.
- 99 Meller CA, Henriques JA, Schwartzmann G, Roesler R. The bombesin/gastrin releasing peptide receptor antagonist RC-3095 blocks apomorphine but no MK-801 induced stereotypy in mice. *Peptides*. 2004;25:585-8.
- 100 Merali Z, Hayley S, Kent P, McIntosh J, Bédard T, Anisman H. Impact of repeated stressor exposure on the release of corticotropin-releasing hormone, arginine-vasopressin and bombesin-like peptides at the anterior pituitary. *Behav. Brain Res*. 2009;198:105–12.
- 101 Merali Z, Kent P, Anisman H. Role of bombesin-related peptides in the mediation or integration of the stress response. *Cell Mol Life Sci*. 2002;59:272-87.

- 102 Miles JH. Autism spectrum disorders - A genetics review. *Genet Med.* 2011;13:278-294.
- 103 Miller M, Bales KI, Taylor SL, Yoon J, Hostetler CM, Carter CS, *et al.*. Oxytocin and vasopressin in children and adolescents with autism spectrum disorders: sex differences and associations with symptoms. *Autism Research.* 2013;6:91-102.
- 104 Minshew NJ, Williams DL. The new neurobiology of autism: cortex, connectivity, and neuronal organization. *Arch Neurol.* 2007;64:945-950.
- 105 Modahl C, Green LA, Fein D, Morris M, Waterhouse L, Feinstein C, *et al.*. Plasma oxytocin levels in autistic children. *Biological Psychiatry.* 1998;43:270-77.
- 106 Montgomery SA, Green MC. The use of cholecystokinin in schizophrenia. *Psychol Med.* 1988;18:593-603.
- 107 Moody TW, Meraly Z. Bombesin-like peptide and associated receptors within the brain: distribution and behavioral implications. *Peptides.* 2004;25:511-20.
- 108 Myers SM, Johnson CP. Management of children with autism spectrum disorders. *Pediatrics.* 2007;120:1162-82.
- 109 Nazeer A, Ghaziuddin M. Autism Spectrum Disorders: Clinical Features and Diagnosis. *Pediatr Clin N Am.* 2012;59:19-25.
- 110 Olivié H. Clinical practice. The medical care of children with autism. *Eur J Pediatr.* 2012;171:741-9.
- 111 Ornitz EM, Ritvo ER. The syndrome of autism: a critical review. *Am J Psychiatry.* 1976;133:609-31.
- 112 Owen R, Sikich L, Marcus RN, Corey-Lisle P, Manos G, McQuade RD, *et al.*. Aripiprazole in the treatment of irritability in children and adolescent with autistic disorder. *Pediatrics.* 2009;124:1533-40.
- 113 Pasha S, Gupta K. Various drug delivery approaches to the central nervous system. *Exp Opin Drug Deliv.* 2010;7:113-35.
- 114 Pereira A, Riesgo RS, Wagner MB. Childhood autism: translation and validation of the Childhood Autism Rating Scale for use in Brazil. *J Pediatr (Rio J).* 2008;84:487-94.
- 115 Petronilho F, Roesler R, Schwartsmann D, Dal Pizzol F. Gastrin-releasing peptide receptor as a molecular target for inflammatory diseases. *Inflamm Allergy Drug Targets.* 2007;6:197-200.
- 116 Posserud MB, Lundervold AJ, Gilberg C. Autistic features in a total population of 7-9-years-old children assessed by the ASSQ (Autism Spectrum Screening Questionnaire). *J Child Psychol Psychiatry.* 2006;47:167-175.
- 117 Presti-Torres J, de Lima MN, Scalco FS, Caldana F, Garcia VA, Guimarães MR, *et al.*. Impairments of social behavior and memory after neonatal gastrin-releasing peptide

- receptor blockade in rats: implications for an animal model of neurodevelopmental disorders. *Neuropharmacology*. 2007;52:724-32.
- 118 Presti-Torres J, Garcia VA, Dornelles A, Halmenschlager LH, Alcalde LA, Vedana G, *et al.*. Rescue of social behavior impairment by clozapine and alterations in the expression of neuronal receptors in a rat model of neurodevelopmental impairment induced by GRPR blockade. *J Neural Transm*. 2012; 119:319-27.
 - 119 Rapin I. Autism. *N Engl J Med*. 1997;337:97-104.
 - 120 Redcay E, Courchesne E. When is the brain enlarged in autism? A meta-analysis of all brain size reports. *Biol Psychiatry*. 2005;58:1-9.
 - 121 Research Units on Pediatric Psychopharmacology Autism Network (RUPP). Randomized, controlled, crossover trial of methylphenidate in pervasive developmental disorders with hyperactivity. *Arch Gen Psychiatry*. 2005;62:1266-74.
 - 122 Research Units on Pediatric Psychopharmacology Autism Network (RUPP). Risperidone in children with autism and serious behavioral problems. Research Units on Pediatric Psychopharmacology (RUPP) Autism Network. *N Engl J Med*. 2002;347:314-21.
 - 123 Rivera FB. Breve revisión histórica del autismo. *Rev Asoc Esp Neuropsiq*. 2007;27:333-53.
 - 124 Roesler R, Henriques JAP, Schwartzmann G. Gastrin-releasing peptide receptor as a molecular target for psychiatric and neurological disorders. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2006a;5:197-204.
 - 125 Roesler R, Henriques JAP, Schwartzmann G. Neuropeptides and anxiety disorders: bombesin receptors as novel therapeutic targets. *TRENDS in Pharmacol Scien*. 2004;25(5):241-2.
 - 126 Roesler R, Luft T, Oliveira SH, Farias CB, Almeida VR, Quevedo J, *et al.*. Molecular mechanisms mediating gastrin-releasing peptide receptor modulation of memory consolidation in the hippocampus. *Neuropharmacology*. 2006b;51:350-7.
 - 127 Roesler R, Schwartzmann G. Gastrin-releasing peptide receptors in the central nervous system: role in brain function and as a drug target. *Front Endocrinol*. 2012;3:159.
 - 128 Rossignol DA. Novel and emerging treatments for autism spectrum disorders: a systematic review. *Ann Clin Psychiatry*. 2009;21:213-36.
 - 129 Roth JD, Maier H, Chen S, Roland BL. Implications of amylin receptor agonism. *Arch Neurol*. 2009;66:306-10.
 - 130 Rutter M. Diagnosis and definition of childhood autism. *J Autism Dev Disord*. 1978b;8:139-61.
 - 131 Rutter M. Diagnosis and definition of childhood autism. *Journal of Autism and Childhood Schizophrenia*. 1978a;8:139-161.

- 132 Rutter M. Progress in understanding Autism: 2007-2010. *J Autism Dev Disord.* 2011;41:395-404.
- 133 Sakamoto H, Matsuda K, Zuloaga DG, Hongu H, Wada E, Wada K, *et al.*. Sexually dimorphic gastrin releasing peptide system in the spinal Cord control male reproductive functions. *Nat Neurosci.* 2008;11:634-6;
- 134 Sakamoto H, Takanami K, Zuloaga DG, Matsuda K, Jordan CL, Breedlove SM, *et al.*. Androgen regulates the sexually dimorphic gastrin-releasing peptide system in the lumbar spinal cord that mediates male sexual function. *Endocrinology.* 2009;150:3672-9.
- 135 Schain RJ, Freedman DX. Studies on 5-hidroxyindole metabolism in autism and other mentally retarded children. *J Pediatrics.* 1961;59:315-20.
- 136 Schopler E, Reichler R, Renner B. *Childhood Autism Rating Scale (CARS).* Los Angeles: Western Psychological Services; 1988.
- 137 Schultz RT. Developmental deficits in social perception in autism: the role of the amygdala and fusiform face area. *Int J Dev Neurosci.* 2005;23:125-141.
- 138 Schumann CM, Barnes CC, Lord C, Curchesne E. Amygdala enlargement in toddlers with autism related to severity of social and communication impairments. *Biol Psychiatry.* 2009;66:943-9.
- 139 Schumann CM, Hamstra J, Goodlin-Jones BL, Lotspeich LJ, Knon H, Buonocore MH, *et al.*. The amygdala is enlarged in children but not adolescents with autism; the hippocampus is enlarged at all ages. *J Neurosci.* 2004;24:6392-6401.
- 140 Schwartsmann G, Di Leone LP, Dal Pizzol F, Roesler R. MAPK pathway activation in colorectal cancer: a therapeutic opportunity for GRP receptor antagonists. *Lancet Oncol.* 2005; 16:444-5.
- 141 Seidita G, Mirisola M, D'Anna RP, Gallo A, Jensen RT, Mantey SA, *et al.*. Analysis of the gastrin-releasing peptide receptor gene in Italian patients with autism spectrum disorders. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2008;147B:807-13.
- 142 Seldas RP. Los síntomas de los transtornos del espectro de autismo en los primeros dos años de vida: una revisión a partir de los estudios longitudinales prospectivos. *An Pediatr (Barc).* 2012;76:41.e1-10.
- 143 Shumyatsky GP, Tsvetkow E, Malleret G, Vronskaya S, Hatton M, Hampton L, *et al.*. Identification of a signaling network in lateral nucleus of amygdale important for inhibiting memory specifically related to learned fear. *Cell.* 2002;111:905-18.
- 144 Sigman M, McGovern CW. Improvement in cognitive and language skills from preschool to adolescence in autism. *J Autism Dev Disord.* 2005; 35:15-23.
- 145 Silver W, Rapin I. Neuroliological Basis of Autism. *Pediatr Clin N Am.* 2012;59:45-61.
- 146 Simonoff E. Autism spectrum disorder: prevalence and cause may be bound together. *Br J Psychiatry.* 2012;201:88-89.

- 147 Simplicio DM, Massey-Chase R, Cowen PJ, Harmer CJ. Oxytocin enhances processing of positive versus negative emotional information in healthy male volunteers. *J Psychopharmacol.* 2009;23:241.
- 148 Spencer SJ, Sharifi P, Wiznitzer M. Autism Spectrum Disorder: Screening, Diagnosis, and Medical Evolution. *Semin Pediatr Neurol.* 2004;11:186-95.
- 149 Spindel ER, Giladi E, Brehm P, Goodman RH, Segerson TP. Cloning and functional characterization of a complementary DNA encoding the murine fibroblast bombesin/gastrin-releasing peptide receptor. *Mol Endocrinol.* 1990;4:1956-63.
- 150 Stanfield AC, McIntosh AM, Spencer MD, Philip R, Gaur S, Lawrie SM. Towards a neuroanatomy of autism: a systematic review and meta-analysis of structural magnetic resonance imaging studies. *Eur Psychiatry.* 2008;23:289-299.
- 151 Stankovic M, Lakic A, Llic N. Autism and autistic spectrum disorders in the context of new DSM-V classification, and clinical and epidemiological data. *Srp Arh Celok Lek.* 2012;140:236-43.
- 152 Stigler KA, McDonald BC, Anand A, Saykin AJ, McDougle CJ. Structural and functional magnetic resonance imaging of autism spectrum disorders. *Brain Res.* 2011;1380:146-61.
- 153 Vargas DL, Nascimbene C, Krishnan C, Zimmerman AW, Pardo CA. Neuroglial activation and neuroinflammation in the brain of patients with autism. *Ann Neurol.* 2005;57(1):67-81.
- 154 Volkmar F, Klin A, Siegel B, Szatmari P, Lord C, Campbell M, *et al.*. Field trial for autistic disorder in DSM-IV. *Am J Psychiatry.* 1994;151(9):1361-7.
- 155 Warren Z, McPheeters ML, Sathe N, Foss-Feig JH, Glasser A, Veenstra-Vanderweele J. S systematic review of early intensive intervention for autism spectrum disorders. *Pediatrics.* 2011;127(5):e1303-11.
- 156 Weisskopf MG, Zalutsky RA, Nicolli RA. The opioid peptide dynorphin mediates heterosynaptic depression of hippocampal mossy fibers synapses and modulates long-term potentiation. *Nature.* 1993;362:423-27.
- 157 Williams K, Wray JA, Wheeler DM. Intravenous secretin for autism spectrum disorders (ASD). *Cochrane Database Syst Rev.* 2012;4: CD003495.
- 158 Wing L, Shah A. Catatonia in autistic spectrum disorders. *Br J Psychiatry.* 2000;176:357-62.
- 159 Wing L. Asperger's syndrome: a clinical account. *Psychol Med.* 1981;11(1):115-29.
- 160 Wójciak P, Remlinger-Molenda A, Rybakowski J. The role of oxytocin and vasopressin in central nervous system activity and mental disorders. *Psychiatr Pol.* 2012;46:1043-52.

**10 ARTIGO 1 – ESTUDO EXPERIMENTAL DE TRÊS CASOS COM O USO DO
PEPTÍDEO LIBERADOR DE GASTRINA EM PACIENTES PEDIÁTRICOS
COM DIAGNÓSTICO DE AUTISMO**

**Estudo Experimental de Três Casos com o Uso do Peptídeo Liberador de Gastrina em
Pacientes Pediátricos com Diagnóstico de Autismo**

Becker MM¹, Freitas VLO², Goldim JR³, Ohlweiler L⁴, Roesler R⁵, Schwartzmann G⁶, Riesgo
RS⁷

¹ Médica neurologista infantil do HCPA, MD

² Pesquisadora do GPPG, MD

³ Chefe do Serviço de Bioética do HCPA, PHD

⁴ Médica neurologista infantil do HCPA, PHD

⁵ Professor do Departamento de Farmacologia da UFRGS, PHD

⁶ Professor de Oncologia da UFRGS, Chefe do Serviço de Oncologia do HCPA, PHD

⁷ Professor de Pediatria da UFRGS, Chefe da Unidade de Neurologia Infantil do HCPA, PHD

Resumo

Os receptores do peptídeo liberador de gastrina (GRPR) têm sido implicados em doenças do sistema nervoso central, incluindo transtornos do neurodesenvolvimento. Estudos sugerem que o bloqueio GRPR durante o desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC) pode levar a alterações comportamentais compatíveis com o transtorno do espectro autista (TEA), e suportam a possibilidade de que uma expressão ou um funcionamento anormal dos GRPR durante o desenvolvimento possa ter um papel na patogênese dessa doença. No presente estudo nós avaliamos a segurança, a tolerabilidade e os possíveis efeitos terapêuticos do peptídeo liberador de gastrina (GRP) administrado endovenosamente a três crianças com autismo infantil, na dose de 160picomol/kg, por 4 dias. Foram identificadas melhoras em graus variáveis nos três casos. Os resultados e as limitações do estudo são discutidos.

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

Abstract

The gastrin-releasing peptide receptors (GRPR) have been implicated in diseases of the central nervous system (CNS), including neurodevelopment disorders. Studies suggest that blocking GRPR during CNS development can lead to behavioral changes compatible with autism spectrum disorders (ASD), and support the possibility that an expression or an abnormal operation of GRPR during development may have a role in the pathogenesis of this disease. In this study we evaluate the safety, tolerability and possible therapeutic effects of gastrin-releasing peptide (GRP) intravenously administered to three children with autism, at a dose of 160picomol/kg, for 4 days. Improvements in varying degrees were identified in all three cases. The results and limitations of the study are discussed.

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

Introdução

O autismo é um transtorno invasivo do desenvolvimento (TID) que se desenvolve precocemente na infância e é caracterizado por grave prejuízo na socialização recíproca, déficits qualitativos na comunicação e comportamentos repetitivos e incomuns (LEVY *et al.*, 2009). Concomitante aos sintomas principais, distúrbios comportamentais mal-adaptativos, como auto e heteroagressão e crises de birra são comuns e frequentemente graves (RESEARCH UNITS ON PEDIATRIC PSYCHOPHARMACOLOGY AUTISM

NETWORK, 2005). Atualmente, o autismo tem prevalência estimada de 1 em cada 88 crianças (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2012). Seu diagnóstico é clínico e até o momento não há tratamento que possibilite a sua cura. Estudos neuroquímicos, neuropatológicos, de neuroimagem e genéticos mostram que o transtorno é uma desordem na organização neuronal cortical, afetando a organização sináptica e dendrítica, a conectividade e a organização cerebral, e que essas mudanças são determinadas por fatores genéticos e ambientais (OLIVIÉ, 2012).

Nos últimos anos, tem-se estudado o efeito de peptídeos endócrinos no SNC (MALAVOLTA e CABRAL, 2011), entre eles o GRP. Estudos propõem que o GRP é liberado por neurônios glutamatérgicos e que age como um neurotransmissor regulador da excitabilidade neuronal (MOODY e MERALI, 2004; ROESLER *et al.*, 2006). No cérebro seu receptor se expressa em alta densidade em áreas cerebrais relacionadas à função cognitiva, ao processamento emocional e a doenças neuropsiquiátricas, como o hipocampo dorsal e a amígdala basolateral (KAMICHI *et al.*, 2005; MOODY e MERALI, 2004; ROESLER *et al.*, 2006). Estudos experimentais mostram que o bloqueio farmacológico do GRPR em ratos durante o período neonatal leva a redução da preferência ao odor materno em testes realizados para avaliar o comportamento de apego em ratos recém-nascidos (GARCIA *et al.*, 2010) e ao desenvolvimento de déficits tardios e permanentes na interação social (PRESTI-TORRES *et al.*, 2007).

No presente estudo foi administrado GRP endovenoso a três crianças com autismo para avaliar segurança, tolerabilidade e possível efeito terapêutico nos sintomas do espectro.

Material e Método

Foram incluídas no estudo crianças com diagnóstico de autismo pelos critérios do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais - 4ª Edição, Texto revisado (DSM-

IV-TR) (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2002), com idade entre 3 e 18 anos. As crianças não poderiam apresentar desordens clínicas sérias, ter outra doença psiquiátrica que requeresse tratamento, ser portadora de condições que se associam a aumento da secreção ácida do sistema gastrointestinal, ter autismo secundário (doença genética, malformações cerebrais, déficits sensoriais) ou ter modificado seu tratamento, medicamentoso ou não, nas quatro semanas anteriores ao início do estudo. Os pais assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido e se comprometeram em não alterar outros tratamentos durante toda a pesquisa.

A amostra foi por conveniência, de crianças atendidas no ambulatório TID do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Foram recrutadas as primeiras três crianças que preencheram os critérios de seleção e aceitaram participar do estudo.

O GRP foi administrado na dose de 160 pmol/kg, endovenoso, em infusão contínua em 30 minutos, por equipe de enfermagem treinada em atendimento de crianças. Os pacientes ficavam em observação por 1 hora após o seu término. A administração foi realizada em leito no Centro de Pesquisas Clínicas do HCPA, na presença de um dos médicos pesquisadores, com rigorosa monitorização dos sinais vitais (pressão arterial e frequência cardíaca) a cada 15 minutos, com a primeira aferição realizada imediatamente antes da infusão. As crianças também eram monitoradas quanto ao surgimento de qualquer efeito adverso. Após a infusão, a família era estimulada a seguir sua rotina diária usual. As infusões foram feitas em 4 dias consecutivos.

A avaliação dos resultados foi realizada através do relato subjetivo dos pais e da aplicação da *Childhood Autism Rating Scale* (CARS) (SCHOPLER *et al.*, 1988) e da *Clinical Global Impression* (CGI). A CARS foi traduzida e validada para uso no Brasil em 2008 por Pereira e colaboradores (PEREIRA *et al.*, 2008). Esta consiste em uma entrevista aplicada aos pais, formada por 15 itens que avaliam 14 domínios do comportamento. Os escores de cada

domínio variam de 1 (dentro dos limites da normalidade) a 4 (sintomas autistas graves). A pontuação varia de 15 a 60, sendo o ponto de corte para autismo 30. A CGI é uma escala simples, respondida pelo pesquisador, universalmente reconhecida e utilizada em *trials* com pacientes com desordens mentais. Apresenta dois componentes, sendo que o primeiro (CGI-S: *Clinical Global Impression – Severity Scale*) avalia a severidade da doença, com escores variando de 1 (normal, não doente) a 7 (doença mental extremamente grave), e o segundo (CGI-I: *Clinical Global Impression – Improvement Scale*) a melhora global desde o início do tratamento, com escores variando de 1 (muito melhor) a 7 (muito pior).

A CARS e a CGI eram aplicadas no dia anterior ao início do GRP e no último dia das infusões.

Cada criança foi submetida a um segundo ciclo de infusões, com intervalo de duas semanas do primeiro ciclo, para comprovação de causa e efeito, e foram acompanhadas semanalmente por período de quatro semanas após o segundo ciclo. O intervalo entre os dois ciclos foi baseado na duração de melhoras objetivas vistas no primeiro caso.

As crianças receberam omeprazol por via oral durante a pesquisa para evitar possíveis efeitos adversos decorrentes da estimulação da secreção ácida no trato gastrointestinal.

O GRP humano utilizado no estudo foi sintetizado pela empresa Biopetide CO. Inc., de San Diego, CA, EUA.

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética Médica do HCPA.

Relato dos Casos

Caso 1

G é um menino de 4 anos e 6 meses, diagnosticado com autismo com 3 anos de idade por neurologista infantil através do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais - 4ª Edição, Texto revisado (DSM-IV-TR) (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION,

2002). Trata-se de um menino agitado, parecendo ter uma energia ilimitada. Teimoso, não aceita “não”, e quando contrariado agride a si mesmo com tapas em sua cabeça, sem heteroagressões. Prefere ficar sozinho, não buscando interação social. Quando pessoas próximas tentam interagir, fixa o olhar de forma fugaz, com graves prejuízos na atenção compartilhada. Se a tentativa de interação for de pessoas estranhas, fica indiferente. Apresenta estereotípias de caminhar na ponta dos pés e esporadicamente de apontar o dedo para seu nariz. Seu interesse é restrito em carrinhos, os quais enfileira, separa por cores, ou retira as rodas, sem qualquer brincar imaginativo. Ele leva-os sempre consigo e não se interessa por outros brinquedos. Apresenta medo incomum ao secador de cabelo, o qual lhe gera pânico. Resiste a mudanças apenas no trajeto para a escola. Tem rituais para dormir e, há alguns meses, compulsão por banhos, precisando ser colocado no banho cerca de 5 ou 6 vezes por dia, sempre que fica muito ansioso, se machuca ou se suja. Fala apenas palavras frases e poucas frases curtas. Não apresenta alterações sensoriais. Ele frequenta escola desde 1 ano e 2 meses e faz acompanhamento fonaudiológico desde os 3 anos de idade. Faz uso de risperidona 2 mg ao dia. CARS 38,5; CGI: moderadamente doente.

Após as infusões, o menino perdeu a compulsão por banhos e o medo pelo secador de cabelo, parou de apresentar estereotípias com as mãos e diminuiu as estereotípias com o corpo, melhorou a tolerância à frustração e a irritabilidade e diminuiu seus rituais para dormir. O paciente apresentou melhora discreta na variedade de interesses, no padrão das brincadeiras e na qualidade da interação social, com mais atenção compartilhada e iniciativas de interação. A perda da compulsão por banhos e do medo anormal ao secador de cabelo e a diminuição das estereotípias ocorreram já no primeiro dia de infusão. Não houve alterações na agitação, na comunicação verbal ou não verbal. CARS: 34; CGI-S: moderadamente doente; CGI-I: melhor.

A melhora dos sintomas objetivos durou duas semanas. Após esse período, o menino foi submetido a novo ciclo de infusões, com resultados semelhantes. A compulsão por banhos e as estereotipais com as mãos novamente desapareceram no primeiro dia das infusões, tendo a melhora se mantido por duas semanas após o seu término.

G não apresentou qualquer efeito adverso nos dois ciclos de GRP.

Caso 2

LO tem 4 anos e teve seu diagnóstico realizado por neurologista pediátrico com 2 anos, através do DSM-IV-TR (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2002). Tem linguagem verbal, e apresenta muitas ecolalias imediatas e tardias. É tranquilo, agitando-se apenas em situações não corriqueiras ou em lugares estranhos. Quando contrariado, tem gritos, auto e heteroagressão (mordidas). Apresenta muitas estereotipias como balanceio, *flapping*, balançar as mãos na frente dos olhos, andar na ponta dos pés ou fazer pequenas corridas. Não tem brincar imaginativo ou interesse por brinquedos. Ele tem fascínio por marcas, logins, letras e números. Não apresenta apego a rotinas, rituais ou manias. Sua interação social é pobre, ignorando totalmente os pares. O menino olha nos olhos dos adultos por pouco tempo e, algumas vezes, os procura. Apresenta pouca resposta emocional, com risos imotivados frequentes. Os pais referem que reage pouco à dor e que esporadicamente coloca objetos na boca ou os cheira. LO faz acompanhamento com fonaudiologia, psicologia e psicopedagoga e tem terapia ocupacional e equoterapia. Estava em uso de risperidona 1,5 mg/dia e valproato de sódio 625mg/dia. CARS: 42; CGI-S: moderadamente doente.

Após o GRP, o menino apresentou discreta melhora na qualidade da comunicação verbal. Ficou mais falante, fazendo mais comentários, com falas novas não treinadas. Tornou-se mais tolerante à frustração e mais sensível à dor. Não teve alterações na interação social ou nas estereotipias. CARS 40,5; CGI-S: moderadamente doente; CGI-I: ligeiramente melhor.

Os pais não conseguiram determinar o tempo de duração do efeito. Após duas semanas, o paciente foi submetido a novo ciclo de infusões com persistência dos resultados até o final do seguimento e não apresentou qualquer efeito adverso com o GRP.

Caso 3

L tem 4 anos e 3 meses e teve seu diagnóstico realizado por neurologista pediátrico com 3 anos, através DSM-IV-TR (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2002). Tem relacionamento interpessoal muito comprometido, isolando-se e interagindo com familiares somente após tentativas persistentes e vigorosas. Sua resposta emocional é muito comprometida, mantendo-se indiferente, com risos imotivados. Caminha na ponta dos pés, dá pulos, apresenta *flapping* e outras estereotípias com as mãos. Não se interessa por brinquedos, não tem brincar imaginativo e não brinca com crianças de sua idade. É um menino agitado, coloca objetos na boca com frequência e parece não sentir dor. Tem fascínio por aberturas de novelas, vinhetas de jornais que assiste na televisão. Fala poucas palavras, não é agressivo e não apresenta manias, rituais ou apego a rotinas. Acompanha com psicologia, psicopedagoga, fonaudiologia e faz terapia ocupacional. Não faz uso de medicações. CARS:41; CGI: moderadamente doente.

Após as infusões, L apresentou diminuição das estereotípias com as mãos e dos risos imotivados. Teve melhora na interação social, com mais sorrisos sociais, maior aceitação de interações iniciadas por pares, melhor atenção compartilhada e maior fixação do olhar. Ficou mais afetuoso, permitindo mais contato físico. Seu brincar ficou mais criativo, com maior variedade de interesses. Tornou-se mais tolerante à frustração e mais sensível à dor. O menino ficou mais falante e pronunciando algumas palavras novas. CGI-S: moderadamente doente; CGI-I: ligeiramente melhor.

Os pais não conseguiram determinar o tempo de duração do efeito. Após duas semanas, ele foi submetido a novo ciclo de infusões com persistência dos resultados até o final do seguimento. O paciente não apresentou efeitos adversos.

A Figura 1 mostra quais sintomas do TEA melhoraram com as infusões de GRP em cada paciente. Os valores da CARS pré e pós infusão são expostos na Figura 2.

Discussão

O autismo infantil é um transtorno que tem atraído cada vez mais o interesse e a preocupação de pesquisadores, de neurologistas e de psiquiatras infantis. Este fato deve-se ao impacto, muitas vezes devastador, que o transtorno pode apresentar nas famílias de indivíduos afetados, ao grande aumento da sua prevalência nos últimos anos e à sobrecarga financeira gerada pelo transtorno. Ganz estima que para cada criança com autismo se gaste aproximadamente US\$3,2 milhões ou US\$35 bilhões com todos os indivíduos diagnosticados com autismo em um ano, ao longo de suas vidas (GANZ, 2007).

Nas últimas décadas, houve um crescimento explosivo no número de pesquisas e publicações sobre o TEA. Buscas por citações no Pubmed utilizando os termos *autism* ou *autistic* mostraram que, durante o ano 1990, foram publicados 213 artigos no tema. No ano de 2009 o número mais que triplicou, com 1522 artigos publicados (AMARAL, 2011). Apesar disso, até o momento não se identificou um marcador biológico para o transtorno ou algum tratamento capaz de curá-lo. Os tratamentos medicamentosos disponíveis agem apenas em sintomas mal-adaptativos associados, sem melhorar os sintomas típicos do espectro. A maioria é usada *off-label*, sendo apenas a risperidona (RESEARCH UNITS ON PEDIATRIC PSYCHOPHARMACOLOGY AUTISM NETWORK, 2005) e o aripiprazol (MARCUS *et al.*, 2009) aprovados pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para tratamento de agressividade, irritabilidade e birra em pacientes com autismo (MCPHEETERS *et al.*, 2011).

Sendo assim, é muito importante que se continue buscando um tratamento específico para TEA.

Muitos estudos sugerem a associação do GRP com distúrbios neuropsiquiátricos, mas sua associação com autismo foi pouco citada na literatura até o momento. Estudos genéticos em humanos têm sugerido uma possível associação entre os receptores de GRP e a regulação de comportamentos sociais e apego. Uma translocação X;8 no primeiro intron do gene do receptor do GRP tem sido identificada em mulheres com exostose múltipla e autismo acompanhado de retardo mental e epilepsia, indicando que o gene do receptor do GRP é um dos genes candidatos no autismo (ISHKAWA-BRUSH *et al.*, 1997). Estudos pré-clínicos recentes, já citados na introdução, levantam a hipótese de que alguns sintomas característicos do transtorno, como déficit de interação social e diminuição de apego, possam ser causados pela falta da ação do GRP em algum momento precoce do desenvolvimento (GARCIA *et al.*, 2010; PRESTI-TORRES *et al.*, 2007).

O GRP já foi administrado por via endovenosa em humanos para avaliação do seu efeito na ingestão alimentar e na dilatação vascular. Em um dos estudos, ele induziu efeitos vasodilatadores transitórios, com volta aos valores normais em cerca de 20 min (CLIVÉ *et al.*, 2001). Em outro ensaio, o GRP foi administrado nas doses de 10, 40 ou 160 pmol/kg por hora em voluntários saudáveis do sexo masculino para avaliação do comportamento alimentar e da saciedade, havendo uma redução significativa na ingestão calórica e uma redução de aproximadamente 19% na ingestão de alimento (GUTZWILLER *et al.*, 1994). A dose de 160 picomol/kg utilizada nesse estudo foi a maior dose encontrada nesses artigos.

Os poucos estudos com GRP em humanos mostram que ele é seguro, o que também sugere esta pesquisa, já que nenhum paciente apresentou efeitos adversos (CLIVÉ *et al.*, 2001; GUTZWILLER *et al.*, 1994).

Os resultados deste relato de casos sugerem que o uso de GRP possa melhorar sintomas-chaves do autismo infantil para os quais ainda não há nenhum tratamento medicamentoso específico.

Dois dos três pacientes apresentaram melhora na interação social, com mudanças discretas na atenção compartilhada e na iniciativa de interação. Esses também apresentaram diminuição das estereotípias, maior variabilidade de interesses e melhora na qualidade das brincadeiras, até então totalmente estereotipadas.

Outros dois casos tiveram melhora na linguagem verbal, com mais falas espontâneas e palavras novas, além de ficarem mais sensíveis à dor e mais tolerantes à frustração, com diminuição de respostas como birras, auto e heteroagressões.

Embora essas melhoras sejam discretas e avaliadas subjetivamente, em um dos casos houve melhora imediata da compulsão, que é uma variável objetiva, fácil de ser mensurada, e que teve relação causa-efeito comprovada através do segundo ciclo de GRP.

Os sintomas que parecem ter melhorado com as infusões de GRP variaram nos três casos, o que pode ser explicado pela grande heterogeneidade dos sintomas presentes em cada paciente previamente às infusões, justificando o termo “espectro autista”. Embora as melhoras tenham sido discretas, é importante ressaltar que este é um estudo pioneiro, em que os pacientes receberam GRP por apenas quatro dias. Não há, até o momento, estudos na literatura que avaliem a segurança do uso a longo prazo do GRP em humanos.

Embora as três famílias tenham achado que houve alguma melhora na CGI-I, houve uma diminuição muito pequena na pontuação da CARS (Figura 2), o que sugere que essa escala possa não ter sido sensível em detectar as mudanças encontradas no estudo, já que essa não especifica os comportamentos encontrados e fornece uma impressão muito ampla sobre os principais sintomas do espectro.

Nesse estudo, o GRP mostrou-se seguro a curto e médio prazo, concordando com os dados encontrados na literatura.

É importante ressaltar que, por ser um relato de casos, este estudo apresenta muitas limitações metodológicas, devendo se interpretar os seus resultados com cautela. Neste estudo foi avaliado um número pequeno de casos, não houve controle ou cegamento, e os resultados foram avaliados de forma subjetiva por relato dos pais.

Conclusão

Este estudo sugere que o GRP possa ter efeito sobre sintomas chaves do autismo infantil, principalmente compulsões. Novos estudos devem ser feitos para melhor avaliar esses resultados, com maior número de pacientes e rigor metodológico, já que a administração do GRP mostrou-se segura e promissora em crianças com autismo infantil.

Agradecimentos

Ao FIPE-HCPA (Fundo de Investimento em Pesquisas e Eventos) pelo suporte financeiro a este estudo.

Referências

- 1 Amaral DG. The promise and the pitfalls of autism research: An introductory note for new autism researchers. *Brain Research*. 2011;1380:3-9.
- 2 American Psychiatric Association. Transtornos Globais do Desenvolvimento. In: American Psychiatric Association. Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais, Quarta Edição, Texto revisado -DSM-IV-TR. 4. ed. Porto Alegre: Artmed; 2002. p. 98-111.
- 3 Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Prevalence of autism spectrum disorders – autism and developmental disabilities monitoring network, 14 sites, United States, 2008. *MMWR Surveill Summ*. 2012;61(3):1-19.

- 4 Clive S, Jodrell D, Webb D. Gastrin-releasing peptide is a potent vasodilator in humans. *Clin Pharmacol Ther.* 2001;69:252-9.
- 5 Ganz ML. The lifetime distribution of the incremental societal costs of autism. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 2007;161:343-9.
- 6 Garcia VA, Dornelles AS, Presti-Torres J, Alcalde LA, Halmenschlager LH, Schwartsmann G, *et al.* Neonatal gastrin-releasing peptide receptor blockade reduces maternal odor preference in rats. *Behav Brain Res.* 2010; 214:456-9.
- 7 Gutzwiller JP, Drewe J, Hildebrand P, Rossi L, Lauper JZ, Beglinger C. Effect of intravenous human gastrin-releasing peptide on food intake in humans. *Gastroenterology.* 1994; 106:1168-73.
- 8 Ishikawa-Brush Y, Powell JF, Bolton P, Miller AP, Francis F, Willard HF, *et al.* Autism and multiple exostoses associated with an X;8 translocation occurring within the GRPR gene and 3 to the SDC2 gene. *Hum Mol Genet.* 1997; 6:1241-50.
- 9 Kamichi S, Wada E, Aoki S, Sekiguchi M, Kimura I, Wada K. Immunohistochemical localization of gastrin-releasing peptide receptor in the mouse brain. *Brain Res.* 2005;1032:162-70.
- 10 Levy SE, Mandell DS, Schultz RT. Autism. *Lancet.* 2009;374(9701):1627-38.
- 11 Malavolta L, Cabral FR. Peptides: Important tools for the treatment of central nervous system disorders. *Neuropeptides.* 2011; 45:309-16.
- 12 Marcus RN, Owen R, Kamen L, Manos G, McQuade RD, Carson WH, *et al.* A placebo-controlled, fixed-dose study of aripiprazole in children and adolescent with irritability associated with autistic disorder. *J Am Acad Child Adolescent Psychiatry.* 2009; 48:1110-9.
- 13 McPheeters ML, Warren Z, Sathe N, Bruzek JL, Krishnaswami S, Jerome RN, *et al.* A Systematic review of medical treatments for children with autism spectrum disorders. *Pediatrics.* 2011;127:e1312-21.
- 14 Moody TW, Merali Z. Bombesin-like peptides and associated receptors within the brain: distribution and behavioral implications. *Peptides.* 2004;25:511-20.
- 15 Olivié H. Clinical practice. The medical care of children with autism. *Eur J Pediatr.* 2012;171:741-49.
- 16 Pereira A, Riesgo RS, Wagner MB. Autismo infantil: tradução e validação da Childhood Autism Rating Scale para uso no Brasil. *J Pediatr (Rio J).* 2008;84(6):487-94.
- 17 Presti-Torres J, de Lima MN, Scalco FS, Caldana F, Garcia VA, Guimarães MR, *et al.* Impairments of social behavior and memory after neonatal gastrin-releasing peptide receptor blockade in rats: Implications for an animal model of neurodevelopmental disorders. *Neuropharmacology.* 2007;52:724-32.
- 18 Research Units on Pediatric Psychopharmacology Autism Network (RUUP). Risperidone Treatment of Autistic Disorder: Longer-Term Benefits and Blinded Discontinuation After

- 6 Months. Research Units on Pediatric Psychopharmacology (RUUP) Autism Network. *Am J Psychiatry*. 2005;162(7):1361-9.
- 19 Roesler R, Luft T, Oliveira SH, *et al.* Schwartsmann G. Molecular mechanisms mediating gastrin-releasing peptide receptor modulation of memory consolidation in the hippocampus. *Neuropharmacology*. 2006;51:350-7.
- 20 Schopler E, Reichler R, Renner B. *Childhood Autism Rating Scale (CARS)*. Los Angeles: Western Psychological Services; 1988.

Figura 1. Sintomas do espectro autista antes e após o GRP

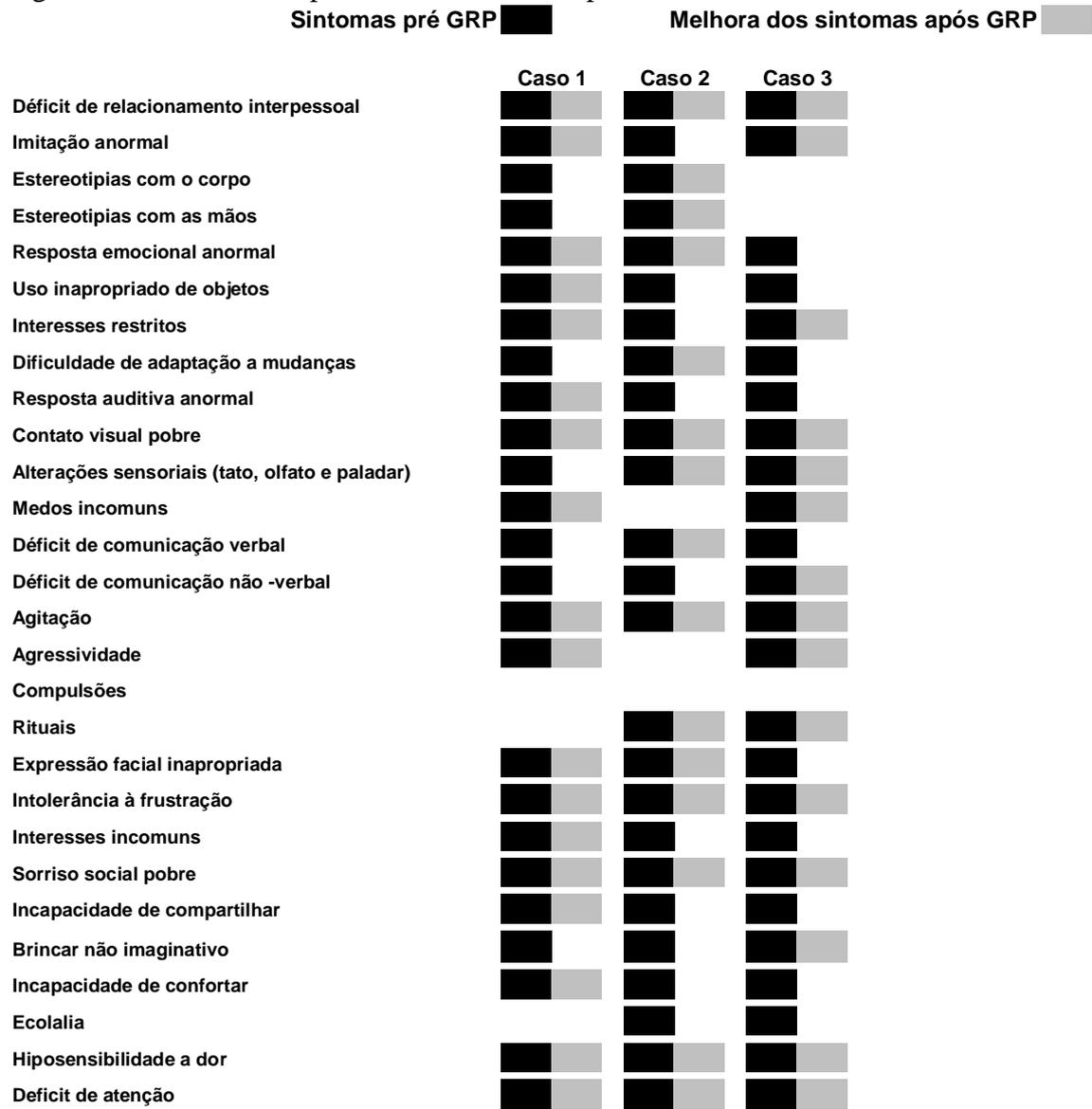
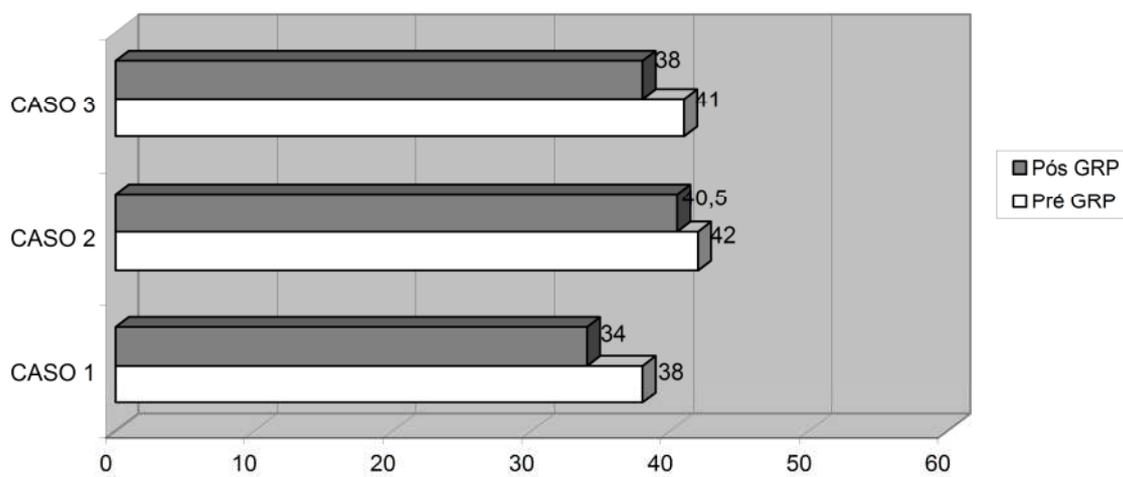


Figura 2. Efeito das Infusões de GRP na *Childhood Autism Rating Scale (CARS)*

11 ARTIGO 2 - ESTUDO EXPERIMENTAL DE SÉRIE DE CASOS COM O USO DO PEPTÍDEO LIBERADOR DE GASTRINA EM PACIENTES PEDIÁTRICOS COM DIAGNÓSTICO DE AUTISMO

Estudo Experimental de Série de Casos com o Uso do Peptídeo Liberador de Gastrina em Pacientes Pediátricos com Diagnóstico de Autismo

Becker MM¹, Riesgo RS², Roesler R³, Bosa C⁴, Ohlweiler L⁵, Backer B⁶, Endres R⁶, Zanon R⁶, Goldim JR⁷, Schwartsmann G⁸

¹ Médica neurologista infantil do HCPA, M.D

² Professor de Pediatria da UFRGS, Chefe da Unidade de Neurologia Infantil do HCPA, Ph.D

³ Professor do Departamento de Farmacologia da UFRGS, Ph.D

⁴ Professora de Psicologia da UFRGS, Ph.D

⁵ Médica neurologista infantil do HCPA, Ph.D

⁶ Psicóloga, doutoranda da UFRGS, M.D

⁷ Chefe do Serviço de Bioética do HCPA, Ph.D

⁸ Professor de Oncologia da UFRGS, Chefe do Serviço de Oncologia do HCPA, Ph.D

Resumo

Introdução Estudos de modelo animal sugerem que o bloqueio dos receptores do peptídeo liberador de gastrina (GRPR) durante o desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC) pode levar a alterações comportamentais compatíveis com o transtorno do espectro autista (TEA), como diminuição da interação social e do apego, e suportam a possibilidade de que uma expressão ou um funcionamento anormal dos GRPR durante o desenvolvimento possa ter um papel na patogênese do transtorno. Recentemente, estudo com administração do peptídeo liberador de gastrina (GRP) a três crianças com autismo sugeriu que ele possa melhorar alguns sintomas do transtorno. **Objetivos** Determinar a efetividade do GRP nos sintomas TEA, assim como sua tolerabilidade e segurança. **Metodologia** Trial aberto e não controlado, com uso de GRP 160 picomol/kg por 4 dias consecutivos, em 10 crianças com

autismo. Os desfechos serão medidos através das escalas *Clinical Global Impression-Improvement Scale* (CGI-I), *Aberrant Behavior Checklist* (ABC), *Childhood Autism Rating Scale* (CARS) e *Autism Diagnostic Interview-Revised* (ADI-R). Considerou-se melhora com GRP valores de 1 (muito melhor) ou 2 (melhor) na CGI-I e melhora $\geq 25\%$ em pelo menos uma das subescalas da ABC. **Resultados** A idade dos participantes variou de 5 a 16 anos (mediana 8). Seis (60%) das 10 crianças tiveram melhora com GRP. Pela escala ABC, 8 (80%) tiveram melhora nas subescalas Irritabilidade e Hiperatividade, 7 (70%) nas subescalas Comportamento estereotipado e Letargia e esquiva social e 4 (40%) na subescala Fala inapropriada. Na CARS, houve uma diminuição média de 4 pontos ($4,3 \pm 2,9$) e na ADI-R houve melhora significativa no domínio de interação social recíproca ($2,4 \pm 2,83$). Efeitos adversos de leve intensidade ocorreram em três pacientes e foram náuseas (20%), vômitos (20%), diarreia (20%) e rash cutâneo (10%). Todos os pacientes completaram o estudo. **Conclusões** Os resultados desse estudo sugerem que o GRP seja seguro, bem tolerado e que possa ser efetivo nos principais sintomas do TEA. Estudos maiores, randomizados, duplo-cegos e controlados por placebo são necessários para que se possa avaliar de forma mais efetiva a segurança e a eficácia do GRP em crianças e adolescentes autistas.

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

Abstract

Introduction Animal model studies suggest that the blocking of gastrin-releasing peptide receptor (GRP) during the development of the central nervous system (CNS) can lead to behavioral changes consistent with autism spectrum disorder (ASD), such as decreased social interaction and attachment, and support the possibility that an expression or an abnormal

operation GRP receptor during the development may have a role in the pathogenesis of the disorder. **Objectives** The aim of this study is determine the effectiveness and tolerability of GRP for core symptoms of autistic disorder. **Methods** This is a prospective, open-label study of GRP 160 picomol/kg for 4 days in 10 children with autism. The outcome measures included de Clinical Global Impressions-Improvement (CGI-I) Scale, all subscales of the Aberrant Behavior Checklist (ABC), Childhood Autism Rating Scale (CARS) and Autism Diagnostic Interview-Revised (ADI-R). Positive response was determined by a rating of 1 (very much improvement) or 2 (much improved) on the CGI-I and a $\geq 25\%$ improvement on at least one subscales of ABC. **Results** Six (60%) of the 10 subjects ages 5-16 years (median 8 years) responded to GRP. On ABC, improvements were observed on the subscales irritability and hyperactivity in 80% of patients; as well as 70% of improvement on subscale social withdrawal, and 40% on subscale inappropriate speech. Regarding CARS, a median decrease of 4 points (4.3 ± 2.9) occurred. Adverse effects occurred in three patients, such as nausea (2/10), vomiting (2/10), diarrhea (2/10) and cutaneous rash (1/10). No subjects withdrew from the study. **Conclusions** The results of this study suggest that GRP may be effective in core symptoms of autism and well tolerated. Larger randomized, double-blind, placebo-controlled studies of GRP in children and adolescents with autism will be needed to determine more definitively the efficacy and safety of GRP in children with autistic disorder.

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

Introdução

O autismo é um transtorno do desenvolvimento que tem como sintomas principais déficits na interação social, na comunicação e na linguagem, comportamentos repetitivos e estereotipados e/ou repertório restrito de interesses (DUCHAN e PATEL, 2012). Apesar dos

avanços no entendimento desse distúrbio, até o momento não se conhece o exato mecanismo etiológico ou um tratamento capaz de reverter completamente seus sintomas (SELDAS, 2012; MYERS e JHONSON, 2007).

Atualmente, o manejo do autismo é multidisciplinar (BENVENUTO *et al.*, 2013; Rossignol, 2009) e apenas duas medicações são aprovadas pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para tratar sintomas disruptivos associados ao transtorno, que são a risperidona (RESEARCH UNITS ON PEDIATRIC PSYCHOPHARMACOLOGY AUTISM, 2002) e o aripiprazol (MARCUS *et al.*, 2009; OWEN *et al.*, 2009).

Recentemente, pesquisas têm sugerido que o GRP esteja implicado em doenças do SNC (ROESLER e SCHWARTSMANN, 2012), incluindo os transtornos do neurodesenvolvimento, como o transtorno do espectro autista. Estudos pré-clínicos mostram que o bloqueio da ação dos GRPR no período neonatal pode levar a alterações comportamentais específicas do TEA, como déficit de interação social (PRESTI-TORRES *et al.*, 2007) e diminuição do apego (GARCIA *et al.*, 2010), o que sugere que uma expressão ou um funcionamento anormal dos GRPR durante o período do desenvolvimento possa ter um papel na patogênese da doença (ROESLER e SCHWARTSMANN, 2012).

Recentemente, em um estudo pioneiro, avaliamos a segurança, a tolerabilidade e os possíveis efeitos terapêuticos do GRP administrado endovenosamente a três crianças com autismo infantil, na dose de 160 picomol/kg, por 4 dias consecutivos. Os três pacientes apresentaram melhora em graus variáveis nos sintomas do espectro, com boa tolerância e sem efeitos adversos (observação não publicada).

No presente estudo, nós administramos GRP a um número maior de crianças autistas e acrescentamos novos instrumentos de avaliação para verificar possíveis efeitos terapêuticos, além da sua segurança e tolerabilidade.

Métodos

Participantes

Foram incluídas no estudo 10 crianças com diagnóstico de autismo infantil pelos critérios do Manual Diagnóstico e Estatístico de Doenças Mentais, 4ª edição, Texto revisado (DSM-IV-TR) (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2002). O diagnóstico foi confirmado pela ADI-R, considerada um dos instrumentos padrão ouro para diagnóstico de autismo (BECKER *et al.*, 2012; LORD *et al.*, 1994). Outros critérios de inclusão eram idade entre 3 e 18 anos, tomografia computadorizada ou ressonância magnética de encéfalo normal e investigação genética com cariótipo e pesquisa de X-Frágil (este apenas para meninos) normal. Foram excluídas do estudo crianças que apresentavam condições associadas ao aumento da secreção ácida no sistema gastrointestinal (ex. gastrite, úlcera gástrica, úlcera duodenal, esofagite de refluxo), diabetes ou cardiopatia, que residissem fora de Porto Alegre ou da região metropolitana e que tivessem autismo secundário (ex. doenças genéticas, déficits sensoriais,...).

Os participantes deveriam estar fisicamente saudáveis. Medicamentos psicotrópicos eram permitidos desde que estivessem com as doses estáveis por ≥ 4 semanas antes do início do estudo e fossem mantidos estáveis durante toda a pesquisa. Indivíduos com diagnóstico de outro transtorno invasivo do desenvolvimento (TID) ou outro transtorno psiquiátrico primário pelo DSM-IV foram excluídos do estudo.

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

Delineamento do estudo

Ensaio clínico aberto, não controlado.

Intervenção

Os pacientes foram submetidos a infusões endovenosas de GRP na dose de 160 picomol/kg, uma vez ao dia, por 4 dias consecutivos.

O GRP humano utilizado no estudo foi sintetizado pela empresa *Biopeptide Co. Inc.*, de San Diego, CA, EUA, e apresenta níveis de pureza adequados para ensaios clínicos.

Local de realização

As infusões de GRP foram realizadas em leitos da sala de infusões do Centro de Pesquisas Clínicas do HCPA. A aplicação dos instrumentos de avaliação e os encontros de seguimento com os pais e ou responsáveis foram realizadas no ambulatório de TID do HCPA. A entrevista ADI-R foi aplicada no Instituto de Psicologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Logística

Os pacientes passavam por uma visita de triagem e seleção, uma visita para avaliação dos sintomas pré-infusão e, após o tratamento, foram avaliados semanalmente por 4 semanas.

Duas semanas antes das infusões de GRP os pacientes iniciavam o uso oral de omeprazol 40mg ao dia para reduzir o efeito do GRP na liberação de gastrina e o risco dos efeitos adversos secundários ao aumento da secreção de ácidos no trato gastrointestinal. Esse era mantido por cinco semanas.

Os instrumentos de avaliação eram aplicados aos pais e/ou responsáveis na semana anterior às infusões. As escalas CGI-S, CARS e ABC eram aplicadas pelo mesmo pesquisador, médico neurologista infantil. A entrevista ADI-R era aplicada por psicólogas treinadas na aplicação e no *reliability* desse instrumento.

A administração de GRP foi diária, por 4 dias consecutivos, em infusão contínua de 30 minutos, ficando o paciente em observação quanto ao surgimento de possíveis efeitos colaterais por 1 hora após o seu término. Durante este período, o paciente era acompanhado por um dos médicos pesquisadores com monitorização dos sinais vitais e de possíveis efeitos adversos. Após o paciente e sua família eram liberados e estimulados a seguirem sua rotina diária habitual.

No último dia de infusão eram aplicadas as escalas CGI-I e CARS. As escalas ABC e ADI-R eram aplicadas na semana seguinte às infusões. Foi considerada resposta ao tratamento valores de 1 (muito melhor) ou 2 (melhor) na CGI e melhora $\geq 25\%$ em pelo menos uma das subescalas da ABC.

As três visitas seguintes eram para a determinação da duração do efeito terapêutico e monitorização de possíveis efeitos adversos, sem haver aplicação de escalas.

Instrumentos de avaliação

Para avaliação dos resultados foram utilizados os instrumentos CGI-I, CARS, ABC e ADI-R.

A CGI possui 2 componentes, com escores variando de 1 a 7: CGI-S: *Clinical Global Impression – Severity Scale*, que avalia a severidade da doença (1=normal, não doente; 2=limítrofe para doença mental; 3=levemente doente; 4=moderadamente doente; 5=marcadamente doente; 6=gravemente doente; 7=doença mental extremamente grave); CGI-I: *Clinical Global Impression – Improvement Scale*) que avalia a melhora global desde o início do tratamento (1=muito melhor; 2=melhor; 3=ligeiramente melhor; 4=sem alteração; 5=ligeiramente pior; 6=pior; 7=muito pior). A escala CGI-S foi utilizada na caracterização da amostra.

A escala ABC avalia efeito de intervenções terapêuticas em indivíduos com deficiência mental. É composta por 58 itens, divididos em 5 subescalas (I-Irritabilidade, agitação e choro;

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

A CGI-I e a ABC já foram utilizadas em trials com antipsicóticos em autismo (RESEARCH UNITS ON PEDIATRIC PSYCHOPHARMACOLOGY AUTISM, 2002, 2005; MARCUS *et al.*, 2009; OWEN *et al.*, 2009), e recentemente a ABC mostrou ter estrutura adequada para avaliação de indivíduos autistas, com boas consistência interna e convergência externa. (KAAT *et al.*, 2013).

A CARS é uma entrevista aplicada aos pais e/ou responsáveis, formada por 15 itens. Os escores de cada domínio variam de 1 (dentro dos limites da normalidade) a 4 (sintomas autistas graves). A pontuação varia de 15 a 60, sendo o ponto de corte para autismo 30 (PEREIRA *et al.*, 2008; SCHOPLER *et al.*, 1988).

A ADI-R é uma entrevista semiestruturada aplicada aos pais e/ou responsáveis. Tem escores de pontuação em três grandes domínios (déficit de interação social, déficit de comunicação, comportamento repetitivo e interesses restritos) e pode ser usada para diagnóstico e avaliação de tratamentos. É constituída de 93 itens, dos quais 42 são avaliados e sistematicamente combinados para produzir o resultado final e interpretável do instrumento (BECKER *et al.*, 2010; LORD *et al.*, 1994). Para cada item há as opções de pontuação 0, 1, 2 ou 3, com os valores maiores associados a maior gravidade dos sintomas. Nos algoritmos de interpretação, deve ser feita a conversão: 0=0, 1=1, 2=2 e 3=2. Esses valores são somados para obtenção do escore final de cada domínio.

Além desses instrumentos, após as infusões os pais ou responsáveis preencheram semanalmente um tabela sobre a evolução dos principais sintomas do TEA, com as opções

bem melhor, melhor, igual, pior ou bem pior, a fim de se determinar a duração dos possíveis efeitos terapêuticos.

Os critério de resposta ao tratamento com GRP foram valores de 1 (muito melhor) ou 2 (melhor) na CGI-I e melhora $\geq 25\%$ em pelo menos uma das subescalas da ABC.

Os dados foram transportados para o programa *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS), versão 18.0, para análise estatística. Na análise descritiva foram utilizados média, mediana e desvio padrão para variáveis quantitativas e frequência para as variáveis qualitativas. Na comparação dos escores das escalas antes e após GRP, foi utilizado o teste t de *Student* para amostras emparelhadas. Considerou-se significativo $p \leq 0,05$. Para cálculo do tamanho de efeito foi utilizado a fórmula *d* de *Cohen*.

Considerações éticas

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA (registro no Grupo de Pesquisas do HCPA 12-0219). Os pais e/ou responsáveis assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, já que os pacientes incluídos no estudo apresentam limitações cognitivas e são menores de idade.

Resultados

A amostra foi constituída de 10 crianças com autismo, sendo 9 do sexo masculino (90%). A idade variou de 5 a 16 anos, com mediana de 8 anos. Seis residiam em Porto Alegre (60%) e 4 na região metropolitana (40%). Todos os pacientes faziam uso de medicações psicotrópicas (100%), sendo a média de 3 medicamentos. Anti-psicóticos (10/10) e anti-convulsivos (8/10) foram os mais frequentes. Em todos os pacientes a dose das medicações foram mantidas estáveis de 4 semanas antes até a conclusão do estudo. Sete (70%) indivíduos faziam pelo menos um tratamento não medicamentoso, entre eles psicologia, terapia

ocupacional, fonaudiologia, hidroterapia ou equoterapia. As características da amostra estão resumidas na Tabela 1.

Todos os pacientes completaram o estudo.

Seis (60%) dos 10 participantes tiveram melhora com o GRP, considerada como valores de 1 (muito melhor) ou 2 (melhor) na CGI-I (Figura 1) e melhora $\geq 25\%$ em pelo menos uma das subescalas da ABC.

Na análise das subescalas da ABC, 8 pacientes apresentaram melhora nas subescala Irritabilidade e Hiperatividade (80%), 7 nas subescalas Comportamento estereotipado e Letargia e esquiva social (70%) e 4 na subescala Fala inapropriada (40%). Os maiores tamanhos de efeito foram encontrados nas subescalas Irritabilidade (1,72) e Letargia e esquiva social (1,57). Os escores das subescalas antes e após o GRP, com seus desvios padrões e tamanho de efeito são descritos na Tabela 2. As diferenças encontradas tiveram significância estatística nas 5 subescalas. Para a subescala Fala inapropriada foi realizada também uma análise apenas com indivíduos verbais (5/10), que encontrou melhora em 3 dos 5 pacientes (60%), porém não foi encontrada significância estatística na diferença dos escores ($p=0,07$).

Na CARS, houve uma redução média de 4 pontos entre os escores pré e pós GRP ($4,3\pm 2,9$; $p=0,001$), com tamanho de efeito de 1,4. A análise individual dos itens da CARS encontrou significância estatística nas questões 1 (Relacionamento Interpessoal, $p=0,015$), 5 (Uso de Objetos, $p=0,032$), 6 (Adaptação a Mudanças, $p=0,025$), 10 (Medo ou Nervosismo, $p=0,037$) e 12 (Comunicação Não-Verbal, $p=0,013$).

A análise dos dados da ADI-R mostrou melhora significativa apenas no domínio que avalia interação social, com diminuição média de 2,4 pontos pós GRP ($2,4\pm 2,83$; $p=0,025$). O tamanho de efeito foi nesse domínio foi de 0,85.

O GRP foi bem tolerado na maioria dos pacientes. Não houve efeitos adversos graves ou alterações significativas na frequência cardíaca e na pressão arterial de nenhuma criança.

Efeitos adversos ocorreram em 3 participantes, sendo náuseas (20%), diarreia (20%), vômitos (20%) e rash cutâneo (10%).

O tempo de duração do efeito do GRP, medido de forma subjetiva pela impressão dos pais, variou de 1 a 4 semanas, durando até 2 semanas em 8 pacientes. Tanto a média quanto a mediana foram de 2 semanas.

Discussão

A falta de um tratamento específico para o TEA (BENVENUTO *et al.*, 2013), o aumento na sua prevalência (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2012; DUCHAN e PATEL, 2012) e o grave comprometimento da qualidade de vida dos indivíduos afetados e de suas famílias faz com que novas pesquisas na busca de tratamentos para o autismo sejam muito importantes.

O papel dos neuropeptídeos no TEA tem sido sugerido desde 1998, após ter sido notada melhora social, cognitiva e comunicativa em 3 crianças autistas que receberam secretina endovenosa durante endoscopia (HORVATH *et al.*, 1998). Desde então, surgiu um grande número de estudos com secretina em indivíduos autistas, porém estudos grandes e recentes, como a revisão sistemática realizada por Krishnaswami e colaboradores (KRISHNASWAMI *et al.*, 2011) e a metanálise realizada por Williams e colaboradores (WILLIAMS *et al.*, 2012) mostram que não há melhora significativa nos sintomas do espectro com o uso de secretina.

Outro neuropeptídeo pesquisado no tratamento do TEA é a oxitocina. Vários estudos têm avaliado o possível efeito da sua administração intranasal e endovenosa em indivíduos autistas, com resultados positivos, como redução dos comportamentos repetitivos (HOLLANDER *et al.*, 2003), aumento da memória social (HOLLANDER *et al.*, 2007) e do processamento emocional (GUASTELLA *et al.*, 2010). Recentemente, um *trial* duplo-cego,

randomizado, e controlado por placebo, com 38 autistas, não encontrou melhora (DADDS *et al.*, 2013), mas novos estudos estão sendo realizados.

O GRP já havia sido administrado por via endovenosa a humanos em dois estudos clínicos, um para avaliação de ingestão alimentar (GUTZWILLER *et al.*, 1994) e outro de dilatação vascular (CLIVE *et al.*, 2001), mostrando-se seguro. A dose de 160 picomol/kg utilizada nesse ensaio clínico foi a maior dose encontrada nesses estudos (GUTZWILLER *et al.*, 1994).

No estudo prévio realizado por este grupo de pesquisa, foi a primeira vez que se administrou GRP em crianças ou em autistas. Nesse estudo, o GRP na dose de 160 picomol/kg mostrou-se seguro e promissor, com melhoras variáveis nos sintomas do espectro autista nas três crianças que participaram do estudo, como compulsões, estereotípias e interação social (observação não publicada).

No presente estudo, GRP mostrou-se novamente seguro, bem tolerado e com poucos efeitos adversos.

Considerando como critério de resposta ao tratamento melhora tanto na escala CGI-I quanto na escala ABC, 6 pacientes (60%) foram responsivos ao GRP, valor próximo ao encontrado no estudo com a risperidona (69%) (RESEARCH UNITS ON PEDIATRIC PSYCHOPHARMACOLOGY AUTISM, 2002). Em estudo realizado por Owen e colaboradores com o aripiprazol, a resposta foi de 30,4% (OWEN *et al.*, 2009). Nos estudos com antipsicóticos o desfecho primário é considerado melhora no escore da subescala irritabilidade. Neste estudo consideramos como desfecho primário melhora em pelo menos uma das subescalas da ABC, já que se trata de um estudo exploratório e o estudo anterior sugeriu melhora em sintomas como interação social, linguagem e comportamentos repetitivos (observação não publicada).

Pela escala ABC, 80 % dos pacientes apresentaram melhora na agitação e nos sintomas de irritabilidade, como auto e heteroagressões, gritos e choros inapropriados, oscilações de humor, impaciência, acessos de fúria e birra. Como três crianças (30%) tinham escores pré-tratamento da subescala Irritabilidade da ABC <18 , estima-se que a melhora nessa subescala poderia ter sido maior se tivessem sido selecionadas apenas crianças com irritabilidade mais grave (≥ 18), como nos estudos que avaliam a eficácia dos antipsicóticos (RESEARCH UNITS ON PEDIATRIC PSYCHOPHARMACOLOGY AUTISM, 2002, OWEN *et al.*, 2009). Esses achados sugerem que o GRP possa ser efetivo em indivíduos autistas com sintomas alvo de irritabilidade. Embora a melhora na agitação tenha sido muito significativa pela escala ABC, a análise isolada da questão XIII da CARS, que avalia nível de atividade, pré e pós-tratamento, não mostrou significância estatística, o que pode ser explicado pelo número pequeno de crianças no estudo.

Quanto às estereotípias, na subescala Comportamento repetitivo da ABC houve melhora em 70% dos pacientes. Geralmente, esses comportamentos são de muito difícil manejo na prática clínica e, até o momento, os estudos mostram que a resposta dos comportamentos repetitivos ao tratamento medicamentoso é muito restrita (BENVENUTO *et al.*, 2013; KAPLAN e MCCRACKER, 2012). O fato de não se ter encontrado melhora significativa na questão IV da CARS, que incluiu estereotípias, e no domínio Padrões restritos, repetitivos e estereotipados de comportamento da ADI-R podem dever-se ao número pequeno de crianças incluídas no estudo e, no caso da ADI-R, a baixa sensibilidade do algoritmo de avaliação de tratamento. Como na ADI-R sintomas moderados e graves recebem a mesma pontuação para a soma do escore final, esse instrumento pode não detectar mudanças comportamentais sutis.

Na área social, 70% apresentaram melhora na subescala Letargia e esquiva social da ABC, que avalia sintomas como isolacionismo, preferência por atividades solitárias, resistência ao contato físico, atenção nas tentativas de interações sociais e pouca expressão

facial e resposta emocional. Esse achado foi corroborado pela CARS, que encontrou significância estatística na questão I, sobre relacionamento interpessoal, e pela ADI-R, que mostrou melhora no domínio Anormalidades Qualitativas na Interação Social Recíproca.

A taxa de melhora na subescala Fala inapropriada da ABC foi menor em relação às outras subescalas (40%), mas significativa. O fato de não se ter encontrado significância estatística na melhora dessa subescala na análise apenas dos pacientes verbais (5/10) deve-se provavelmente ao número pequeno de indivíduos para análise.

Neste estudo, a duração dos efeitos do GRP foi de até duas semanas na maioria dos pacientes, conforme descrição dos pais e/ou cuidadores. A literatura descreve a meia-vida curta dos peptídeos *in vivo*. Muitos peptídeos são depurados da corrente sanguínea dentro de poucos minutos a algumas horas após a sua administração (MCGONIGLE, 2012). No estudo de Clive *et al.* (2001) foi encontrado efeito vasodilatador de início muito rápido e com duração aproximada de 20 minutos com a administração endovenosa de GRP, sugerindo que a sua meia vida seja rápida. Por outro lado, estudos pré-clínicos mostram que os efeitos do GRP e de outros peptídeos podem ser mais duradouros (ROESLER e SCHWARTSMANN, 2012).

Os resultados encontrados neste estudo devem ser analisados com cautela, já que muitos fatores podem interferir na sua validade. O fato de não ter havido cegamento pode limitar as conclusões quanto à eficácia e à tolerabilidade do GRP e também influenciar nos tamanhos de efeito. Pelo caráter exploratório do estudo, a amostra foi pequena e não há como medir possível efeito placebo por não haver controle. Além disso, o GRP foi administrado por curto período, não se podendo afastar a possibilidade de algumas melhoras terem ocorrido ao acaso. Apesar dessas limitações, os resultados do estudo são animadores e sugerem a viabilidade de se realizar um ensaio clínico maior com o uso de GRP em crianças e adolescentes com autismo.

Conclusões

Os resultados deste estudo sugerem que o GRP é bem tolerado e que pode ser efetivo em melhorar sintomas do autismo, principalmente déficits de interação social e sintomas associados à irritabilidade. Estudos maiores, randomizados, duplo-cegos e controlados por placebo com a administração de GRP em crianças e adolescentes com autismo serão necessários para melhor avaliar a sua eficácia e a sua segurança.

Agradecimentos

Ao FIPE-HCPA (Fundo de Investimento em Pesquisas e Eventos) pelo suporte financeiro a este estudo.

Referências

- 1 Aman MG, Singh NN, Stewart AW, Field CJ. The aberrant behavior checklist: a behavior rating scale for the assessment of treatment effects. *Am J Ment Defic.* 1985;89:485-91.
- 2 American Psychiatric Association. *Transtornos Globais do Desenvolvimento. Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais, Quarta Edição, Texto revisado - DSM-IV-TR. 4ª ed.* Porto Alegre: Artmed; 2002. p.98-111.
- 3 Becker MM, Wagner MB, Bosa CA, Schmidt C, Longo D, Papaleo C, Riesgo RS. Translation and validation of Autism Diagnostic Interview-Revised (ADI-R) for autism diagnosis in Brazil. *Arq Neuropsiquiatr.* 2012;70(3):185-90.
- 4 Benvenuto A, Battan B, Porfirio MC, Curatolo P. Pharmacotherapy of autism spectrum disorders. *Brain Dev.* 2013;35:119-27.
- 5 Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Prevalence of autism spectrum disorders – autism and developmental disabilities monitoring network, 14 sites, United States, 2008. *MMWR Surveill Summ.* 2012;61(3):1-19.
- 6 Clive S, Jodrell D, Webb D. Gastrin-releasing peptide is a potent vasodilator in humans. *Clin Pharmacol Ther.* 2001; 69(4):252-9.
- 7 Dadds MR, MacDonald E, Cauchi A, Williams K, Levy F, Brennan J. Nasal Oxytocin for Social Deficits in Childhood Autism: A Randomized Controlled Trial. *J Autism Dev Disord.* 2013 Jul 26. [Epub ahead of print]
- 8 Duchan E, Patel DR. Epidemiology of Autism Spectrum Disorders. *Pediatr Clin N Am.* 2012;59:27-43.

- 9 Garcia VA, Dornelles AS, Presti-Torres J, Alcalde LA, Halmenschlager LH, Schwartsmann G, *et al.*. Neonatal gastrin-releasing peptide receptor blockade reduces maternal odor preference in rats. *Behav Brain Res.* 2010;214:456-9.
- 10 Guastella AJ, Mitchell PB, Dadds MR. Oxytocin increases gaze to the eye region of human faces. *Biological Psychiatry.* 2008;63:3-5.
- 11 Gutzwiller JP, Drewe J, Hildebrand P, Rossi L, Zwimpfer L, Beglinger C. Effect of Intravenous Human Gastrin-Releasing Peptide on Food Intake in Humans. *Gastroenterology.* 1994;106:1168-73.
- 12 Hollander E, Bartz J, Chaplin W, Phillips A, Sumner J, Soorya L, *et al.*. Oxytocin increases retention of social cognition in autism. *Biol Psychiatry.* 2007;61:498-503.
- 13 Hollander E, Novotny S, Hanratty M, Yaffe R, DeCaria CM, Aronowitz BR, *et al.*. Oxytocin infusion reduces repetitive behaviors in adults with autistic and Asperger's disorders. *Neuropsychopharmacology.* 2003;28:193-8.
- 14 Horvath K, Stefanatos G, Sokolski KN, Wachtel R, Nabors L, Tildon JT. Improved social and language skills after secretin administration in patients with autistic spectrum disorders. *J Assoc Acad Minor Phys.* 1998;9(1):9-15.
- 15 Kaat AJ, Lecavalier L, Aman MG. Validity of the Aberrant Behavior Checklist in Children with Autism Spectrum Disorder. *J Autism Dev Disord.* 2013 Oct 29. [Epub ahead of print]
- 16 Kaplan G, McCracken JT. Psychopharmacology of Autism Spectrum Disorders. *Pediatr Clin N Am.* 2012;59:175-87.
- 17 Krishnaswami S, McPheeters ML, Veenstra-VanderWeele J. A Systematic Review of Secretin for Children With Autism Spectrum Disorder. *Pediatrics.* 2011;127(5):e1322-5.
- 18 Lord C, Rutter M, Le Couteur A. Autism Diagnostic Interview-Revised: A Revised Version of a Diagnostic Interview for Caregivers of Individuals with Possible Pervasive Developmental Disorders. *J Autism and Dev Disord.* 1994;24(5):659-85.
- 19 Losapio MF, Silva LG, Pondé MP, Novaes CM, dos Santos DN, Argollo N, *et al.*. Partial cross-cultural adaptation of the Aberrant Behavior Checklist (ABC) scale for analysis of patients with mental retardation. *Cad Saude Publica.* 2011;27(5):909-23.
- 20 Marcus RN, Owen R, Kamen L, Manos G, McQuade RD, Carson WH, *et al.*. A placebo-controlled, fixed-dose study of aripiprazole in children and adolescent with irritability associated with autistic disorder. *J Am Acad Child Adolescent Psychiatry.* 2009;48:1110-9.
- 21 McGonigle P. Peptide therapeutics for CNS indications. *Biochem Pharmacol.* 2012;83:559-66.
- 22 Myers SM, Johnson CP. Management of children with autism spectrum disorders. *Pediatrics.* 2007;120(5):1162-82.

- 23 Owen R, Sikich L, Marcus RN, Corey-Lisle P, Manos G, McQuade RD, *et al.*. Aripiprazole in the treatment of irritability in children and adolescent with autistic disorder. *Pediatrics*. 2009;124:1533-40.
- 24 Pereira A, Riesgo RS, Wagner MB. Childhood autism: translation and validation of the Childhood Autism Rating Scale for use in Brazil. *J Pediatr (Rio J)*. 2008;84(6):487-94.
- 25 Presti-Torres J, de Lima MN, Scalco FS, Caldana F, Garcia VA, Guimarães MR, *et al.*. Impairments of social behavior and memory after neonatal gastrin-releasing peptide receptor blockade in rats: implications for an animal model of neurodevelopmental disorders. *Neuropharmacology*. 2007;52:724-32.
- 26 Research Units on Pediatric Psychopharmacology Autism (RUPP). Risperidone treatment of autistic disorder: Longer-term benefits and blinded discontinuation after 6 months. *Am J Psychiatry*. 2005;162:1361-1369.
- 27 Research Units on Pediatric Psychopharmacology Autism Network (RUPP). Risperidone in children with autism and serious behavioral problems. Research Units on Pediatric Psychopharmacology (RUPP) Autism Network. *N Engl J Med*. 2002;347:314-21.
- 28 Roesler R, Schwartzmann G. Gastrin-releasing peptide receptors in the central nervous system: role in brain function and as a drug target. *Front Endocrinol*. 2012;3:159.
- 29 Rossignol DA. Novel and emerging treatments for autism spectrum disorders: a systematic review. *Ann Clin Psychiatry*. 2009;21:213-36.
- 30 Schopler E, Reichler R, Renner B. Childhood Autism Rating Scale (CARS). Los Angeles: Western Psychological Services; 1988.
- 31 Seldas RP. Los síntomas de los trastornos del espectro de autismo en los primeros dos años de vida: una revisión a partir de los estudios longitudinales prospectivos. *An Pediatr (Barc)*. 2012;76(1):41.e1-41.e10.
- 32 Williams K, Wray JA, Wheeler DM. Intravenous secretin for autism spectrum disorders (ASD). *Cochrane Database Syst Ver*. 2012;18:4 doi: 10.1002/14651858.

Tabela 1. Características da amostra no início do estudo (n=10)

Característica	Número de crianças
Idade	
3-10 anos	6/10
11-18 anos	04/10
Sexo masculino	09/10
Tratamento não-farmacológico	07/10
Tratamento farmacológico	10/10
Antipsicóticos	10/10
Anticonvulsivos	08/10
Inibidores seletivos da recaptação da serotonina	02/10
Antidepressivos tricíclicos	02/10
Classificação pela <i>Clinical Global Impression-Severity Scale</i>	
Moderadamente doente	04/10
Marcadamente doente	03/10
Gravemente doente	02/10
Doença mental extremamente grave	01/10
Escore na <i>Aberrant Behavior Checklist</i>	Média±DP
Irritabilidade	22,1±8,7
Letargia e esquiva social	18,6±10,0
Comportamento estereotipado	8,6± 5,2
Hiperatividade	24,6± 9,0
Fala inapropriada	3,5± 4,5
Escore na <i>Childhood Autism Rating Scale</i>	45,1±5,7
Escore na <i>Autism Diagnostic Interview-Revised</i>	
Anormalidades na interação social	20±8,6
Anormalidades na comunicação	12,7±4,6
Padrões restritos, repetitivos e estereotipados de comportamento	8,1±2,8

Figura 1. Efeito do GRP nos sintomas do espectro autista pela escala *Clinical Global Impression – Improvement Scale (CGI-I)*

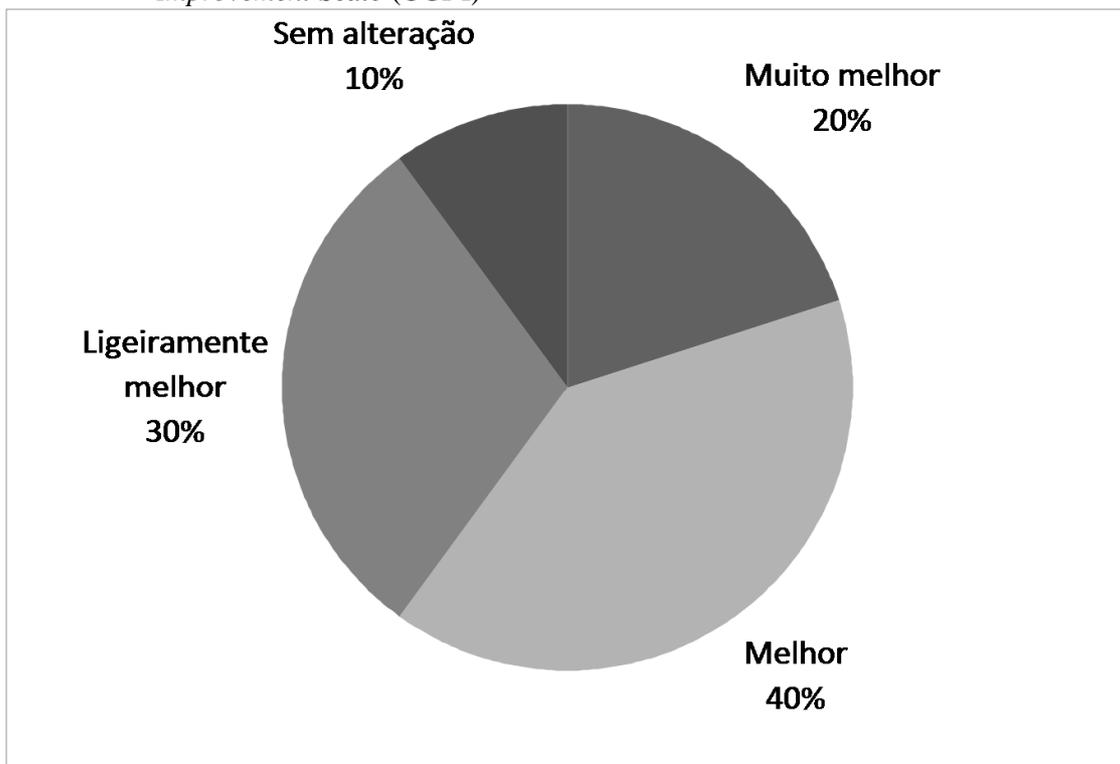


Tabela 2. Escores da escala *Aberrant Behavior Checklist* antes e após GRP

Subescala	Pré-GRP	Pós-GRP	p	Tamanho efeito
Irritabilidade	22,1±8,7	13,3±7,6	<0,001	1,72
Letargia e esquiva social	18,6±10,0	12,0±8,9	0,01	1,57
Comportamento estereotipado	8,6±5,2	5,3±4,9	0,02	0,86
Hiperatividade	24,6±9,0	16,5±8,2	0,02	1,39
Fala inapropriada	3,5±4,5	2,4±3,9	0,04	0,76

*Média±DP

12 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O TEA tem grande impacto na qualidade de vida dos indivíduos afetados e de sua família, podendo ser devastador nos casos mais graves. Infelizmente, apenas uma pequena minoria desses indivíduos consegue trabalhar, viver de forma independente e desenvolver relacionamentos sociais significativos. A grande maioria permanece muito dependente do suporte dos pais ou de outros cuidadores.

Sete décadas se passaram desde que o autismo foi primeiramente descrito por Kanner. Apesar dos avanços nos conhecimentos sobre a etiologia, o diagnóstico precoce e o tratamento não medicamentoso, ainda não conhecemos um marcador biológico ou um tratamento específico para esse transtorno. Além disso, nas últimas décadas vemos a sua prevalência aumentar grandemente sem encontrarmos uma explicação exata.

Tudo isso faz com que estudos sobre a patogênese e o tratamento do TEA sejam muito importantes e urgentes, devendo ser incentivados.

Este é um estudo inicial, de caráter exploratório, e é o primeiro estudo que administra GRP a crianças ou a indivíduos com autismo. Assim, trata-se de um estudo com número pequeno de participantes e pouco rigor metodológico, mas de grande relevância clínica. Ele garante a viabilidade de se realizar um estudo com maior número de crianças e rigor metodológico, já que o GRP se mostrou seguro e com boa tolerabilidade.

Os resultados deste estudo sugerem que o GRP possa ser efetivo em melhorar sintomas específicos do espectro autista, principalmente compulsões e déficits na interação social, além dos sintomas de baixa tolerância à frustração, auto e heteroagressividade e crises de birra.

Pelas limitações metodológicas deste estudo, os resultados devem ser avaliados com cautela, já que a falta de cegamento e de aferição do efeito placebo podem afetar os resultados quanto à eficácia, à tolerabilidade e os tamanhos de efeito. Além disso, o GRP foi

administrado por curto período, não se podendo afastar a possibilidade de algumas melhoras terem ocorrido ao acaso.

Assim, os resultados encontrados neste estudo são promissores, mas estudos maiores, randomizados, duplo-cegos e controlados por placebo com a administração de GRP em crianças e adolescentes com autismo serão necessários para melhor avaliar a sua eficácia e a sua segurança.

APÊNDICE A - CRITÉRIOS PARA DIAGNÓSTICO DE TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA PELO DSM-5

- A) Déficits clinicamente significativos e persistentes na comunicação social e nas interações sociais, manifestadas de todas as seguintes maneiras:**
1. Déficits na reciprocidade social e emocional, variando, por exemplo, desde abordagem social anormal até a incapacidade de manter uma conversação; prejuízo no compartilhamento de interesses, emoções ou afeto; falha ao iniciar ou manter interações sociais;
 2. Déficit em comportamentos comunicativos não verbais usados nas interações, variando, por exemplo, desde uma comunicação verbal e não verbal pobremente integrada; a anormalidades no contato visual e linguagem corporal ou déficits no entendimento e uso de gestos; a total ausência de expressão facial e comunicação não-verbal;
 3. Déficits no desenvolvimento, na manutenção e no entendimento dos relacionamentos, variando, por exemplo, de dificuldades no ajuste de comportamentos em contextos sociais sutis; a dificuldades em compartilhar brincadeiras imaginativas ou fazer amigos; a ausência de interesses em pares;
- B) Padrões restritos e repetitivos de comportamento, interesses ou atividades, manifestados por pelo menos dois dos seguintes abaixo, atualmente ou pela história:**
1. Movimentos motores, uso de objetos ou discurso estereotipados ou repetitivos (ex. estereotípias motoras simples, alinhamento de brinquedos ou arremesso de objetos, ecolalia, frases idiossincráticas);
 2. Insistência na monotonia, aderência inflexível a rotinas, ou padrões ritualizados de comportamento verbal ou não-verbal (ex. angústia extrema em pequenas mudanças, dificuldades com mudanças, padrões de pensamento rígidos, rituais de saudação, necessidade de ir sempre pelo mesmo caminho ou comer a mesma comida todos os dias);
 3. Interesses fixos, altamente restritos, que são anormais na intensidade ou no foco (ex. forte apego ou preocupação com objetos não usuais, interesses excessivamente restritos ou perseverantes);
 4. Hiper ou hiporreatividade a estímulos sensoriais ou interesses não usuais em aspectos sensoriais do ambiente (ex. aparente indiferença à dor ou à temperatura, resposta adversa a sons e a texturas específicas, cheirar ou tocar excessivamente objetos, fascinação visual com luzes ou movimento);
- C) Os sintomas devem estar presentes no início da infância (mas podem não se manifestar completamente até que as demandas sociais excedam o limite de suas capacidades, ou podem ser mascaradas por estratégias aprendidas durante a vida);**
- D) Os sintomas causam prejuízos significativos nas áreas social, ocupacional ou em outras áreas importantes do funcionamento atual.**
- E) Esses distúrbios não podem ser melhor explicados por déficit intelectual (transtorno do desenvolvimento intelectual) ou por atraso global no desenvolvimento. Deficiência intelectual e transtorno do espectro autista frequentemente ocorrem juntos; para fazer o diagnóstico de transtorno do espectro autista e deficiência intelectual, a comunicação social deve estar abaixo da esperada para o nível geral de desenvolvimento.**

**APÊNDICE B - CRITÉRIOS PARA DIAGNÓSTICO DE AUTISMO CLÁSSICO
PELO DSM-IV-TR**

- A. 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).**
- 1. Marcante déficit na interação social, manifestada por pelo menos dois dos seguintes itens:**
 - a. Destacada diminuição no uso de comportamentos não-verbais múltiplos, tais como contato ocular, expressão facial, postura corporal e gestos na interação social.
 - b. Dificuldade em desenvolver relações de companheirismo apropriadas para o nível de comportamento.
 - c. Falta de procura espontânea em dividir satisfações, interesses ou realizações com outras pessoas, por exemplo: dificuldades em mostrar, trazer ou apontar objetos de interesse.
 - d. Ausência de reciprocidade social ou emocional.
 - 2. Marcante déficit na comunicação, manifestada por pelo menos um dos seguintes itens:**
 - a. atraso ou ausência total de desenvolvimento da linguagem oral, sem ocorrência de tentativas de compensação através de modos alternativos de comunicação, tais como gestos ou mímicas.
 - b. em indivíduos com fala normal, destacada diminuição da habilidade de iniciar ou manter uma conversa com outras pessoas.
 - c. ausência de ações variadas, espontâneas e imaginárias ou ações de imitação social apropriadas para o nível de desenvolvimento.
 - 3. Padrões restritos, repetitivos e estereotipados de comportamento, interesses e atividades, manifestados por pelo menos um dos seguintes itens:**
 - a. Obsessão por um ou mais padrões estereotipados e restritos de interesse que seja anormal tanto em intensidade quanto em foco.
 - b. Fidelidade aparentemente inflexível a rotinas ou rituais não funcionais específicos.
 - c. Hábitos motores estereotipados e repetitivos, por exemplo: agitação ou torção das mãos ou dedos, ou movimentos corporais complexos.
 - d. Obsessão por partes de objetos.
- B. Atraso ou funcionamento anormal em pelo menos uma das seguintes áreas, com início antes dos 3 anos de idade:**
- 1. Interação social.**
 - 2. Linguagem usada na comunicação social.**
 - 3. Ação simbólica ou imaginária.**
- C. O transtorno não é melhor classificado como transtorno de Rett ou doença degenerativa infantil.**

APÊNDICE C - TERMO DE ESCLARECIMENTO PARA VOLUNTÁRIOS

Termo de esclarecimento para voluntários

Estamos realizando uma pesquisa com pacientes autistas.

Até os dias de hoje, ainda não há nenhum tratamento específico para o autismo. Os tratamentos disponíveis melhoram apenas sintomas, como a agitação e a agressividade.

Nos últimos anos, estamos estudando uma substância chamada peptídeo liberador de gastrina (GRP). Estudos em animais mostram que a sua deficiência pode desenvolver sintomas autistas, como falta de apego e diminuição da interação social.

Já existem pesquisas em pessoas com o GRP, principalmente em estudos sobre alterações alimentares e apetite. A administração desta substância em pessoas foi segura, com poucos efeitos colaterais, como o aumento da secreção de ácidos no estômago. O risco de úlceras é muito baixo se o paciente receber tratamento adequado.

Nesta pesquisa, daremos GRP pela veia por 4 dias a um grupo de pacientes com diagnóstico de autismo, e avaliaremos se há melhora nos sintomas desse transtorno. A avaliação dos sintomas será realizada através de entrevistas com a família, onde serão feitas perguntas sobre o comportamento do paciente e sua capacidade de interação social e comunicação. A substância será administrada pela veia (via endovenosa), neste hospital, com muito cuidado quanto ao surgimento de qualquer efeito colateral, na presença de um dos médicos pesquisadores. Daremos uma medicação para evitar o aumento de secreção ácida do estômago e diminuir o risco de úlcera. Pelo que sabemos até o momento, a administração desta substância a seres humanos é segura e não traz risco de vida.

Lembramos que não há certeza de que esta substância será eficaz em melhorar os sintomas do seu (a) filho (a), que este é um experimento.

A participação nesta pesquisa não implicará em qualquer custo para o paciente ou para a sua família e não garantirá atendimento no HCPA para os pacientes externos que participarem da pesquisa.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Se houver interesse em participar do estudo, solicitamos que o questionário em anexo seja preenchido pelo médico assistente (neurologista ou psiquiatra) e entregue na Secretaria do Serviço de Oncologia Pediátrica (HCPA, 3º andar, leste) com Sra. Rosana Rodrigues (telefone 33598012 ou 91140419). É necessário que o paciente tenha diagnóstico de autismo clássico e que este não seja secundário a outras doenças, como distúrbios genéticos, malformações cerebrais e déficits sensoriais (como cegueira ou surdez). Os casos serão selecionados de acordo com os critérios de inclusão e exclusão do estudo. Se houver um número maior de voluntários que o número de pacientes que serão incluídos na pesquisa, esses serão selecionados por ordem de entrega do formulário.

Contato:

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

Porto Alegre, _____ de 201__.

APÊNDICE D - FICHA DE IDENTIFICAÇÃO DE VOLUNTÁRIOS

Nome do paciente: _____

Nome completo dos pais: _____

Telefone para contato com os pais: _____

Data de nascimento: _____

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

Idade em que recebeu o diagnóstico: _____

Exames prévios (descrever os que tiver):

-eletroencefalograma: _____

-tomografia computadorizada ou ressonância magnética de crânio: _____

-exames genéticos: _____

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

Tratamentos medicamentosos prévios (nome dos medicamentos): _____

Tratamentos não farmacológicos:

- () fonoaudiologia () psicologia
- () terapia ocupacional () psicomotricista () ambientoterapia
- () ecoterapia () hidroterapia

Local em que realiza os tratamentos: _____

Nome do médico neurologista assistente: _____

Telefone para contato com o médico assistente: _____

Carimbo e assinatura do médico (a)

APÊNDICE E - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Estamos realizando uma pesquisa com crianças autistas.

Até os dias de hoje, ainda não há nenhum tratamento específico para o autismo. Os tratamentos disponíveis melhoram apenas sintomas, como a agitação e a agressividade.

Nos últimos anos, estamos estudando uma substância chamada peptídeo liberador de gastrina (GRP). Estudos em animais mostram que a sua deficiência pode desenvolver sintomas autistas, como falta de apego e diminuição da interação social.

Já existem pesquisas em pessoas com o GRP, principalmente em estudos sobre alterações alimentares e apetite, mas são poucos. A administração desta substância em pessoas foi segura, com poucos efeitos colaterais, como o aumento da secreção de ácidos no estômago. O risco de úlceras é muito baixo se o paciente receber tratamento adequado.

Nesta pesquisa, daremos GRP por via endovenosa a um grupo de pacientes com diagnóstico de autismo, e avaliaremos se há melhora nos sintomas desse transtorno. A avaliação dos sintomas será realizada através de entrevistas com a família, onde serão feitas perguntas sobre o comportamento do paciente e sua capacidade de interagir e de se comunicar com outras pessoas. Será necessário que o paciente e um responsável compareçam a este hospital na semana anterior e posterior às infusões para que o paciente seja avaliado e, na semana das infusões, todos os dias pela manhã, de segunda à sexta-feira. Não há necessidade de internação hospitalar.

A substância será administrada por via endovenosa, neste hospital, com monitorização quanto ao surgimento de qualquer efeito colateral, na presença de um dos médicos pesquisadores. Comprometemo-nos em suspender imediatamente a infusão do GRP se houver surgimento de qualquer efeito colateral. Daremos uma medicação para evitar o aumento de secreção ácida do estômago e diminuir o risco de úlcera. Pelo que sabemos até o momento, a administração desta substância a seres humanos por um período curto de tempo é segura e não traz risco de vida.

Lembramos que não há certeza de que esta substância será eficaz em melhorar os sintomas do seu (a) filho (a), que este é um experimento, e que o mesmo foi realizado em poucos pacientes autistas até o momento. Nesses pacientes a administração da substância não teve nenhum efeito indesejável, mostrou-se segura e teve alguns resultados positivos.

A substância estudada não está disponível comercialmente no nosso país atualmente. Este estudo visa avaliar efeitos a curto prazo. Não se conhecem efeitos com o uso prolongado desta substância. Mesmo que haja benefícios no (a) seu (a) filho (a) com a utilização da substância, no momento essa não será fornecida para utilização após o término do estudo, pois novas pesquisas serão necessárias para avaliar sua segurança em utilização a longo prazo. Se houver claro benefício nos sintomas do (a) seu (a) filho (a) e se as pesquisas mostrarem que o seu uso a longo prazo é seguro, nos responsabilizados em fornecer o GRP para o tratamento do (a) seu (a) filho (a).

A participação nesta pesquisa não implicará em qualquer custo para o paciente ou para a sua família.

A não participação nesta pesquisa não implicará em qualquer mudança no atendimento do seu filho caso ele seja paciente do ambulatório de neurologia infantil.

A participação nesta pesquisa de pacientes que não acompanham no Hospital de Clínicas de Porto Alegre não garante seguimento neste hospital após o término da pesquisa.

A identidade do seu filho será mantida em sigilo durante toda a pesquisa e a divulgação dos resultados.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

O paciente e seus responsáveis receberão uma cópia deste termo de consentimento.

Se surgirem dúvidas ou qualquer intercorrência, os pesquisadores podem ser encontrados nos telefones abaixo.

“Nós, _____ (nome do pai) e _____
(nome da mãe), pais do (a) paciente _____ autorizamos nosso (a)
filho (a) a participar desta pesquisa.”

(Assinatura do pai)

(Assinatura da mãe)

Contatos:

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

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

Comitê de Ética em Pesquisa (telefone 33597640)

Nome do pesquisador que aplicou o TCE

Assinatura do pesquisador que aplicou o TCE

Porto Alegre, ____ de _____ de 201__.

APÊNDICE F - TABELA DOS SINTOMAS DO ESPECTRO AUTISTA PARA OS PAIS OU RESPONSÁVEIS

COMPORTAMENTO	BEM MELHOR	MELHOR	IGUAL	PIOR	BEM PIOR
1.Contato visual (fixar olhar)					
2.Interação com familiares					
3.Interação com pessoas não próximas					
4.Interação com outras crianças					
5.Sorriso em resposta ao sorriso de alguém (social)					
6.Atender ao chamado pelo nome					
7.Imitar outras pessoas					
8.Resposta emocional inadequada (ex. riso ou choro sem motivo)					
9.Uso inapropriado de objetos ou brinquedos (ex. enfileirar, girar rodas,...)					
10.Apego à rotina, não tolerar mudanças					
11.Reação exagerada ou pouca reação a sons					
12.Pouca reação à dor					
13.Colocar objetos na boca, cheirar ou ficar explorando textura					
14.Medos incomuns ou exagerados					
15.Prejuízo na fala					
16.Prejuízo na comunicação por gestos					
17.Agitação					
18.Agressão a si mesmo					
19.Agressão aos outros					
20.Movimentos repetitivos com as mãos					
21.Movimentos repetitivos com o corpo					
22.Interesse apenas nas mesmas coisas					
23.Interesses incomuns (ex. ventiladores, semáforos,...)					
24.Uso da mão de outra pessoa como se fosse a sua					
25.Compulsões					
26.Rituais					
27.Intolerância à frustração					